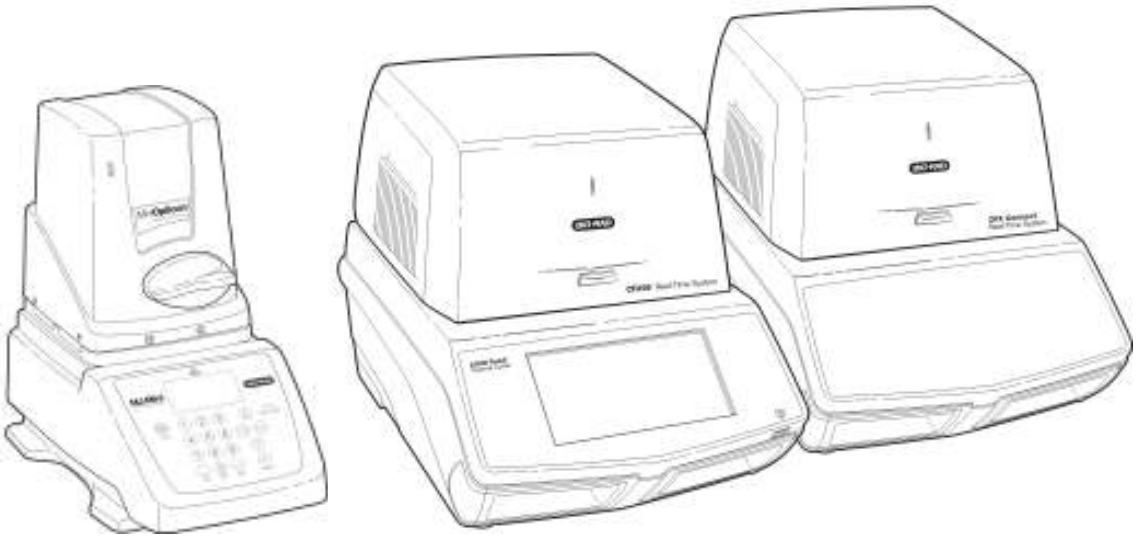
CFX384 Touch™, CFX96 Touch Deep Well™, CFX96 Touch™, CFX Connect™, MiniOpticon™ リアルタイム PCR 解析システム （CFX Manager ソフトウェア ver3.0）取扱説明書

カタログ番号　185-5484J1, 185-5484J4, 185-4095J1,
185-5196J1, 185-5196J2, 185-5196J3, 185-5196J4
185-5201J1, 185-5201J4, CFD-3120J1



注 意

・製品をご使用になる前に、本取扱説明書をよくお読みください。
・本書の注意事項は必ずお守りください。
・本取扱説明書は、必要な時にすぐに取り出して読めるように大切に保管してください。

BIO-RAD

バイオ・ラッド テックコール

製品の学術的お問い合わせ並びに修理・メンテナンスに関するお問い合わせは弊社テックコールにお問い合わせください。

受付時間：月曜日～金曜日（祝祭日を除く）
AM9:00～PM5:00 （日本標準時：JST）

電話: 03-6404-0331
Fax: 03-6404-0334
Email: life_ps_jp@bio-rad.com

以下の Web でオンラインでのテクニカルサポート並びに製品情報等をご参照頂けます。

Web：www.bio-rad.com.

LICENSE NOTICE TO PURCHASER

Bio-Rad real-time thermal cyclers CFX96 Touch™, CFX96 Touch™ Deep Well, CFX Connect™, CFX384 Touch™ and MiniOpticon™ are licensed real-time thermal cyclers under Applera's United States Patent No. 6,814,934 B1 for use in research, human in vitro diagnostics, and all other fields except veterinary diagnostics.
This CFX96, CFX96 Touch™ Deep Well, CFX Connect, CFX384 or MiniOpticon detection module, when combined with a C1000™ or C1000 Touch™ thermal cycler for which the applicable real-time thermal cycler royalty fee has been paid, constitutes a real-time thermal cycler licensed under U.S. Patent No. 6,814,934 and corresponding claims in any Canadian counterpart patent thereof owned by Applera Corporation, for use solely in research, human in vitro diagnostics, and all applied fields except veterinary in vitro diagnostics. These license rights are effective only if this detection module is combined with a Bio-Rad thermal cycler for which the applicable real-time thermal cycler royalty fee has been paid and not with any other thermal cycler. No rights are conveyed expressly, by implication or estoppel to any patents on real-time methods, including but not limited to 5' nuclease assays, or to any patent claiming a reagent or kit. For further information on purchasing license rights, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.
This product is covered by one or more of the following U.S. patents or their foreign counterparts owned by Eppendorf AG: U.S. Patent Numbers 6,767, 512 and 7,074,367.
Hard-Shell plates are covered by one or more of the following U.S. patents or their foreign counterparts owned by Eppendorf AG: U.S. Patent Numbers 7,347,977, 6,340,589, and 6,528,302.

Trademarks and Legal Notices

Adobe, Acrobat, and Reader are trademarks of Adobe Systems Incorporated. Cy is a trademark of GE Healthcare Group companies. CAL Fluor and Quasar are trademarks of Biosearch Technologies, Inc. SYBRR and Texas Red are trademarks of Invitrogen Corporation. EvaGreen is a trademark of Biotium, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc., is licensed by Biotium, Inc., to sell reagents containing EvaGreen dye for use in real-time PCR, for research purposes only. FAM, HEX, ROX, and VIC are trademarks of Applera Corporation. qbasePLUS is a trademark of Biogazelle. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Invitrogen Corporation to sell reagents containing SYBRR Green I for use in real-time PCR, for research purposes only. Excel, Microsoft, PowerPoint,Windows, and Windows Vista are trademarks of Microsoft Corporation.
その他、 本マニュアルに記載の社名および商品名は、 各社の商標または登録商標です。
本書では下記のように省略して記載している場合がございます。ご了承ください。

- Windows XP の正式名称は、Microsoft® Windows® XP Operating Systemです。
- Windows 7の正式名称は、Microsoft® Windows® 7 Operating Systemです。
- Wordの正式名称は、Microsoft® Word®です。
- Excelの正式名称は、Microsoft® Excel®です。
- PowerPointの正式名称は、Microsoft® PowerPoint®です。

Copyright
Copyright©2013 Bio-Rad Laboratories, Inc. 本書の内容は、印刷または電子形態などのいかなる形式によっても、バイオ・ラッド・ラボラトリー株式会社の書面による許可なしに複製することを禁じます。
マニュアルの内容は予告なしに変更されることがあります。また、本マニュアルに誤記や不正確な記述があった場合、バイオ・ラッドラボラトリーズはいかなる責任も負いません。

バイオ・ラッド ラボラトリーズの情報サービス

弊社では科学研究者を対象として多くの資料等情報をご提供しております。以下に示すウェブサイトでは実験に有益な情報を提供しております。

- **Life Science Research web site　　http://www.bio-rad.com**

  このウェブサイトでは、技術的な情報、取扱説明書、製品情報、技術サポートなどの情報へアクセスして頂けます。さらに、製品に関連する実験手法と多様なアプリケーションに関する技術情報もご提供しています。

表 1 に、弊社が提供する情報サービスと情報の入手方法を示します。

表 1. バイオ・ラッド社の技術情報サービス

リソース	問い合わせ方法
各地域での弊社営業所	弊社ウェブサイト(www.bio-rad.com)から住んでいる国を選択して、地域の情報を確認します。または本取扱説明書巻末のリストから、最寄りの営業所を探してください。
技術参考資料や文献	弊社ウェブサイト(www.bio-rad.com)にアクセスしてください。検索ボックスにキーワードを入力し、ドキュメント(Documents)を選択して技術情報、取扱説明書、その他の必要な参考資料へのリンクを表示します。
技術専門要員(テックコール)	弊社では、高品質の技術サポート体制を整えています。また、技術サポート部門に経験豊富なスタッフを配置しており、お客様のお問い合わせに対応して、実践的で専門的な解決方法をご提供いたします。 技術サポートをご希望の場合は、弊社テックコールへご連絡ください。テックコールの連絡先は本書「バイオ・ラッド　テックコール」の項目をご参照ください。

この取扱説明書について

本書は CFX384 Touch/CFX96 Touch Deep Well/CFX96 Touch/CFX Connect/MiniOpticon リアルタイム PCR 解析システムを安全に設置し、操作する方法をご案内するものです。該当する情報を速やかに提供するため、本書では下表に記載された表記法が使われています。

表 2. 本取扱説明書に使用される専用表記

表記	説明
参考情報:	本書でさらに詳しい説明を加える場合などで有益となる情報や取扱方法などが記載されます。
注意:	本書でさらに詳しい説明を加える場合などで重要となる情報が記載されます。
警告！	使用者への傷害、機器への傷害、データ消失の原因などに関連した事項であり、重大な情報が記載されます。
X 項目＞Y 項目	ツールバー、メニューまたはソフトウェアウインドウから X 項目を選択し、次に Y 項目を選択することを示します。

本書および製品で使用される安全使用の表示マークについては、iv ページの「製品を安全性ご使用いただくために」を参照してください。

保証

本製品とその付属品における不具合については 1 年間保証いたします。保証期間中に本体あるいは付属品に不具合が発見された場合、不具合のある部品の修理を無償にて行います。ただし、消耗品は保証対象外となります。

下記の場合は保証対象外となります。

1. 適切でない使用方法による故障
2. 弊社あるいは弊社が認定した者以外が、修理あるいは改造を行った場合
3. 指定以外の部品を使用したために起きた故障
4. 弊社以外から供給された部品等を使用した場合
5. 事故あるいは間違った使用方法によって生じた故障
6. 天災による故障
7. サンプルなどによって生じた腐蝕

保証期間内であっても、再度の納品検収、移動設置、製品点検については有償となります。保証期間外でも修理によって機能が維持できる場合には有償にて修理を承ります。

修理の依頼およびお問い合わせは、機器のモデル名とシリアルナンバーを添えてお近くの弊社営業所あるいは弊社販売代理店までお願いいたします。

この機器の使用目的に合わない状態での使用や、弊社あるいは弊社指定の者以外による改造によって怪我あるいは災害にあわれた場合、弊社では一切の責任を負いません。

保証内容の詳細については、製品付属の製品保証書をご参照ください。

保証登録

保証サービスをお受けいただく際には登録が必要になります。必ず保証書に必要事項を記入の上、弊社へ FAX 頂くか以下のウェブサイトからご登録をお願いいたします。

http://warranty-registration.bio-rad.co.jp/registration.htm

製品保証書は修理時などに必要になりますので、大切に保管してください。

修理依頼について

修理をご依頼される際には修理品と一緒に不具合詳細を記載する「修理依頼書」と運搬者や作業者の安全を確保するための「デコンタミネーション確認のお願い」をコピーして、ご記入の上、修理品と一緒に弊社販売代理店へお引き渡し下さい。両書類は本書 Appendix1 および 2 に掲載されています。

製品を安全にご使用いただくために

はじめに

バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社　ライフサイエンス事業部が販売している製品はすべて研究用途を目的として販売しております。医療用・医療診断機器ではありません。研究用途以外は使用しないでください。
製品の仕様・外観は改良のため予告なしに変更されることがありますので、予めご了承願います。

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon の各システムはその操作によって迅速に加熱冷却し、データを収集することができる機器です。本機器を安全に操作するため、本章および本書中に記載する安全性基準を順守してください。

安全確保のための警告表示

機器本体および本書に表示される警告表示は、使用者に感電の危険性といった傷害または損害の原因について警告するためのイラストです。表 3 に、安全性に関する警告マークを説明します。

表 3. 安全性に関する警告表示の意味

	注意：バイオハザード！このマークは、バイオハザード物質に汚染されている可能性があるコンポーネントを示しています。
	注意：危険のおそれあり！ このマークは、正しく取り扱わなかった場合に、使用者に傷害が生じるおそれのある機器部分を示します。このマークが表示される場合は、必ず本書を読んで内容をよく確認したうえで操作を進めてください。
	注意：表面が加熱されている！ このマークは、正しく取り扱わなかった場合、加熱した機器によって使用者に傷害が生じるおそれがある機器部分を示します。

機器安全性に関する警告

表 4 に示す警告マークはサーマルサイクラー本体の画面にも表示されるものであり、オプティカルリアクションモジュールを安全に使用する場合に役立てます。

表 4. 機器の安全性に関する警告マーク

アイコン	説明
	人体や機器本体に傷害を与えるおそれがあることの警告 本書の解説を読まずに各リアルタイム PCR 解析システムを操作すると、使用者が傷害を受けるおそれがあります。安全に使用するため、本書に記載されていない方法によって機器を操作しないでください。電気機器を安全に使用するための研修を受け、正式な承認を得ている研究スタッフが本機器を使用してください。本機器の各部品については、手指を洗浄し水気を十分に拭き取ったうえで、清潔かつ丁寧に取り扱ってください。
	バイオハザード物質の取り扱いについての警告 バイオハザードサンプルを取り扱う際、推奨される注意事項やガイドラインに従うことと、実験室および施設に固有のローカルなガイドラインに準拠してください。
	火傷リスクの警告 サーマルサイクラーを操作すると、重度の火傷を生じるほどに加熱されます。操作時は、かならず保護用ゴーグルやそれに準じる眼部保護用具を装用してください。サンプルブロックの温度が十分に下がっていることを確認したうえで、リッドを開け、サンプルを取りだしてください。火傷を避けるため、非操作時には本機器から十分離れてください。

爆発リスクの警告
サンプルブロックは、その正常な操作によってサンプル液を沸騰・爆発する程度まで加熱させることが可能となります。

注意: C1000 Touch サーマルサイクラーの取扱い方法については、C1000 Touch™ サーマルサイクラー取扱説明書を参照してください。

安全にご使用頂くための注意事項

警告！ CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon の各システムや他のアクセサリーの外側ケースを取り外そうとしたり修理しようとしたりしないでください。本装置の外部ケースを開けると、感電によって負傷したり、装置が損傷したりする危険性があります。

表 5 に、CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムの安全使用に関する規格を示します。クラス A FCC 規制に準拠するため、同梱のシールドケーブルを必ず使用してください。本装置をご使用の際には安全のため、表 3 の動作環境条件を順守してご使用ください。

表 5:安全にご使用いただくための動作環境条件

設置場所	屋内使用のみ
使用温度	15～31℃
最大相対湿度	最大 80%(但し結露のないこと)
高度	2,000 m 以下
動作電源	100～240 V
周波数	50/60 Hz

注意:本ユニットを水がかかる可能性のある場所に保管したり、使用したりしないでください。感電の原因となることがあります。またユニットを、実験台の端で保管したり、使用したりしないでください。

安全規格への順守

本機器は、以下に記載する安全性および電磁場に関する基準の該当要件に適合していることが試験により確認されています。

- IEC 61010-1:2001 (第 2 版), EN61010-1:2001.(第 2 版).測定、制御及び研究室用電気機器、第 1 部:一般的要求事項。
- IEC 61010-2-010:2005, EN61010-2-010:2003. 測定、制御及び研究室用電気機器に関する要件、第 2 部-010:材料加熱用実験機器に関する特別要求事項。
- IEC 61010-2-081:2001+A1, EN61010-2-081:2002+A1.測定、制御及び研究室用電気機器に関する安全性要件、第 2 部-081:分析用および他目的用の自動および半自動実験機器に関する特別要求事項(改訂 1 を含む)。
- EN 61326-1:2006 (クラス A)測定、制御及び研究室用電気機器.EMC 要求事項、第 1 部:一般的要求事項

本機器は、高周波エネルギーを発生し、それを使用し、放射することを可能とする機器であるため、本取扱説明書の記載事項に準拠して設置し使用されない場合には、無線通信において有害な干渉を生じるおそれがあります。一般住宅地域で本機器を稼働させた場合には、有害な干渉を生じる可能性が高く、その場合には、使用者が自費によってその干渉を補正しなければなりません。

危険性

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムは製造業者によって規定された方法で使用したときに、安全に動作するように設計されています。CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムまたはその関連コンポーネントのいずれかを製造業者が指定した以外の方法で使用されている場合は、機器によって提供される固有の保護機能が損なわれる可能性があります。バイオ・ラッドは、指定しない方法でこの装置の使用によるいかなる怪我、またはバイオ・ラッドまたは認定代理店によって行われていない機器への改造によって生じた損害について責任を負うものではありません。CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムに関わる修理サービスは、バイオ・ラッド担当者が実行する必要があります。

バイオハザード

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムは研究室向けの製品です。バイオハザードのサンプルが存在する場合、次のガイドラインに従って、そして研究室や施設に固有のローカルなガイドラインに準拠してください。

一般的な予防策

- 常に実験用手袋、白衣、横がシールドされた安全グラスまたはゴーグルを着用する。
- 手は口、鼻、目に触れないようにする。
- 潜在的な感染性物質を扱う前に、切り傷や擦り傷は保護しておく。
- 潜在的な感染性物質を扱った後、実験室を出る前に石鹸と水でよく手を洗う。
- ベンチで作業する前に、腕時計やジュエリーをはずす。
- 割れない漏れ防止のコンテナ内ですべての感染性物質、潜在的な感染性物質を保管する。
- 実験室を離れる前に、保護服は脱ぐ。
- 手袋をつけた手で、書いたり、電話に出たり、ライトのスイッチをつけたり、他の誰かが手袋無しで触る可能性があるものに触らないようにする。
- 手袋は頻繁に変える。手袋が目に見えて汚染されているときには、すぐに手袋をはずす。
- 潜在的な感染性物質として適切に汚染除去できない物質は露出させない。
- バイオハザード物質が関与する操作が完了したら、適切な消毒剤で作業領域を除染する(例えば、1:10 希釈の市販漂白剤)。
- バイオハザード物質は、本機器の通常の操作中には排出されていない。

表面の汚染

警告! 感電事故を防ぐために、常に汚染除去の手順を実行する前には機器を電源オフにして電源コードを抜いてください。

次の部分は、病院用殺菌剤、殺ウイルス剤、または殺菌消毒剤で洗浄することができます。

- リッドと本体の外部
- 内部のリアクションブロック表面とリアクションブロックのウェル
- コントロールパネルとディスプレイ

消毒剤を準備し、適用するには、製品の製造業者が提供する手順を参照してください。常に消毒剤を適用した後のリアクションブロックとリアクションブロックのウェルは水で数回すすいでください。徹底的に水で洗浄した後、リアクションブロックとリアクションブロックのウェルを乾燥させます。

警告！研磨剤や腐食性の洗剤または、強いアルカリ性溶液を使用しないでください。これらの溶液は、表面に傷を付けると正確な熱制御が失われるような損傷をリアクションブロックに与える可能性があります。

バイオハザード物質の廃棄

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムは潜在的な有害化学物質を含んでいません。
次に示す潜在的な汚染物質の廃棄は研究室、地域、そして国内規制に準拠してください。

- 臨床サンプル
- 試薬
- 使用した汚染されている可能性がある反応容器または他の消耗品

化学物質的危険

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムは潜在的な化学物質を含んでいません。

爆発または燃焼性の危険

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムは、バイオ・ラッドで指定された適切な方法で使用される限り、可燃性または爆発に関する一切の異常な危険をもたらすものではありません。

電気的危険

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムが物理的な改良を加えることなく、適切な仕様の電源に接続されていて、適切に設置、操作されている場合には、異常な電気的危険をもたらすものではありません。

輸送

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムを移動または出荷する前に、汚染除去の作業を実行する必要があります。MiniOpticon を除く、CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch の各システムは C1000 Touch サーマルサイクラー本体(CFX Connect の場合には、CFX Connect サーマルサイクラー)と CFX96, CFX96Deep Well, CFX Connect Optics または CFX384 オプティカルリアクションモジュールを別々の容器で付属の梱包材で常に損傷から機器から保護して、移動または輸送してください。適切な容器が見つからない場合は、お近くのバイオ・ラッドの営業所にお問い合わせください。

廃棄

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon 各システムは電気的物質を含んでいます。European Union Directive 2002/96/CE on waste and electronic equipment（WEEE Directive）に従って、それは分別廃棄物として処分されるべきであり、別々に収集する必要があります。

目次

バイオ・ラッド テックコール ..... **i**
バイオ・ラッド ラボラトリーズの情報サービス ..... **ii**
保証 ..... **iii**
製品を安全にご使用いただくために ..... **iv**
第 1 章－リアルタイム PCR 解析システムのセットアップ **1**
CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch のセットアップ 2
システムの使用条件 2
システムについて 2
システムのセットアップ 5
CFX Connect リアルタイム PCR システムのセットアップ 7
MiniOpticon リアルタイム PCR システムのセットアップ 9
CFX Manager ソフトウェアのインストール 11
ソフトウェアファイル 12
実験の実行 13
第 2 章－CFX Manager ソフトウェア **16**
メインソフトウェアウインドウ 18
ツールバーボタン 20
Startup Wizard 21
Detected Instruments ペイン 21
ステータスバー 22
Instrument Properties ウインドウ 22
Properties タブ 23
Shipping Screw タブ 23
Calibrated Dyes タブ 24
Master Mix Calculator 25
Scheduler 26
Scheduler のセットアップ 27
Scheduler メニューバー 27
Scheduler のイベント入力 28
イベントのクリーンアップ 29
Scheduler オプション 29
第 3 章－ランの実行 **30**
Run Setup ウインドウ 31
PrimePCR ラン 32
Protocol タブ 33
End Point Only Runs（エンドポイント限定ラン） 33
Plate タブ 33
Start Run タブ 34
機器コントロール用ボタン 35
Run Details ウインドウ 35
Run Status タブ 36
Run Status タブ画面のボタン 36
Real-Time Status タブ 37
Plate ファイルの編集 38
Plate ファイルの変更 38
Time Status タブ 38
Instrument Summary ウインドウ 38

Instrument Summary ウインドウのツールバー 39
第 4 章－プロトコール 40
Protocol Editor ウインドウ 41
Protocol Editor ウインドウ 41
Protocol Editor ウインドウ 41
Protocol Editor のメニューバー 42
Protocol Editor の操作 43
Insert Step ボタン 43
Plate Read の追加と削除 43
Insert Gradient ボタン 44
Insert GOTO ボタン 44
Insert Melt Curve ボタン 45
Step Options ボタン 45
Delete Step ボタン 46
温度制御モード 46
Protocol AutoWriter 47
Protocol AutoWriter でのプロトコール作成 47
第 5 章－プレート設定 49
Plate Editor ウインドウ 50
Plate Editor を開く 50
Plate Editor メニューバー 51
Plate Editor ツールバー 52
プレートサイズおよびタイプ 53
Scan Mode 53
Trace Styles 53
Setup Wizard 54
Select Fluorophores ウインドウ 55
ウェルローディングコントロール 56
Experiment Settings ウインドウ 59
Well Selector 右クリックメニュー項目 61
Well Groups Manager ウインドウ 61
ウェルグループの作成 61
Plate Spreadsheet View ウインドウ 63
第 6 章－スタンドアローンモードでの操作 66
ホームスクリーン 67
ラン設定 68
新規プロトコールの作成 68
ランパラメータの変更 69
プロトコールの保存 69
プロトコールの実行 70
過去に保存したプロトコールの実行 71
ランの監視 71
解析のためのデータ出力 74
USB フラッシュドライブを使ってのデータ出力 74
E メールによるデータ出力 74
データファイルの作成 75
E メールの設定 75
Gmail サーバーの設定 75

カスタムサーバーの設定 76
サーバーの削除 77
第 7 章－データ解析について 78
Data Analysis（データ解析）ウインドウ 79
Data Analysis ツールバー 80
Data Analysis メニューバー 81
Quantification（定量）タブ 82
Step Number セレクター 83
Data Analysis ウインドウでの Well Group 表示 83
データ解析設定 83
Threshold（閾値）の調整 83
ベースラインの設定 84
ベースラインの調整 85
Analysis Mode 85
Cycles to Analyze 86
ウェルセレクター 86
ウェルセレクターでの右クリックメニュー項目 87
データ解析からの一時的ウェル除外 88
グラフ 89
右クリックメニュー項目 89
スプレッドシート 90
スプレッドシート用の右クリックメニュー主要項目 90
エクスポート（データ出力） 91
Excel へのすべてのデータシート出力 91
RDML ファイル出力 91
カスタム出力 91
LIMS フォルダへの出力 92
第 8 章－Data Analysis ウィンドウ 93
Quantification（定量）タブ 94
Fluorophore Selector 95
Trace Styles（トレーススタイル）ウインドウ 95
対数スケールのオプション機能 96
Stardard Curve グラフ 98
右クリックメニュー項目 98
Quantification タブスプレッドシート 99
Quantification（定量データ）タブ 99
Results スプレッドシート 99
Standard Curve Results スプレッドシート 100
Plate スプレッドシート 101
RFU スプレッドシート 101
Melt Curve（融解曲線）タブ 102
Melt Curve Data（融解曲線データ）タブ 104
Melt Peaks（融解曲線ピーク）スプレッドシート 104
Plate スプレッドシート 105
RFU スプレッドシート 105
-d(RFU)/dT スプレッドシート 106
End Point（エンドポイント）タブ 106
エンドポイントデータ解析での調整 108

エンドポイント解析用のデータ項目 108
Allelic Discrimination（対立遺伝子識別）タブ 108
対立遺伝子識別データの調整 109
Allelic Discrimination タブ画面のスプレッドシート 111
Custom Data View タブ 111
QC タブ 112
QC 不合格のウェルの排除 113
Run Information（ラン情報）タブ 113
データファイル用レポート 114
データ解析レポートの作成 115
データ解析レポートのカテゴリー 116
Well Group レポート 117
第 9 章－遺伝子発現解析 119
遺伝子発現 120
遺伝子発現解析でのプレート設定 121
プレート設定ガイド 122
Bar Chart（棒グラフ） 123
遺伝子発現データの正規化 123
Relative Quantity（相対量） 124
遺伝子発現データの調整 124
右クリックメニュー項目 126
データスプレッドシート 126
詳細情報の表示 127
Experiment Settings ウインドウ 128
Biological Set のオプション機能 128
Experiment Settings ウインドウでの分析設定の表示 129
Clustergram 130
設定 130
右クリックメニューオプション 131
データスプレッドシート 131
Scatter Plot 131
設定 131
右クリックメニューオプション 131
データスプレッドシート 132
Volcano Plot 132
設定 132
右クリックメニューオプション 132
データスプレッドシート 133
Heat Map 133
設定 133
右クリックメニューオプション 133
データスプレッドシート 133
Results 133
Gene Study 134
Gene Study でのインターランキャリブレーション 134
Gene Study ウインドウ 135
Study Setup タブ 136
Study Analysis タブ 137

Gene Study Report ウインドウ 137
データ解析に使用する計算式 139
増幅効率 139
相対量 139
対照を選択した場合の相対量 139
相対量の標準偏差 140
効率校正 Cq（Cq_E） 140
平均効率校正 Cq（Mcq_E） 140
正規化係数 140
正規化発現 141
対照選択時での正規化発現 141
正規化発現の標準偏差 141
最高発現レベルで基準化した正規化発現 142
最低発現レベルで基準化した正規化発現 142
平均発現レベルで基準化した正規化発現 142
基準化した正規化発現の標準偏差 143
レギュレーション 143
補正値の計算式 144
第 10 章－ユーザー基本設定 146
ログインまたはユーザー選択 147
パスワードの変更 148
User Preferences ウインドウ 148
Email タブ 149
Files タブ 150
Protocol タブ 150
Plate タブ 151
Data Analysis タブ 152
Gene Expression タブ 154
QC タブ 155
Custome Export タブ 155
ユーザー管理 156
ソフトウェアユーザーの追加・削除 157
ユーザー役割の権限指定 158
第 11 章－情報サービス 159
自動のソフトウェアと機器のアップデート 160
サーマルサイクラー部からのデータファイル回収 161
LIMS 統合 161
LIMS フォルダとデータ出力オプションの設定 161
LIMS プロトコールの作成 163
LIMS ファイルの作成 163
LIMS ランの開始 165
LIMS へのデータ出力 166
キャリブレーションウィザード 166
CFX96 Touch および CFX384 Touch システムのキャリブレーション 167
機器メンテナンス 168
オプティカルリアクションモジュールのクリーニング 168
Application Log（アプリケーションログ） 170
トラブルシューティング 171

データファイルのリカバー 171
サーマルサイクラー部からのログファイルの回収 171
ソフトウェアの手動インストール 171
ドライバの再インストール 171
電源トラブル 171
参考文献 173
Appendix 175
Appendix 1: 修理依頼書 176
Appendix 2: デコンタミネーション確認のお願い 177

第 1 章－リアルタイム PCR 解析システムのセットアップ

1　リアルタイム PCR 解析システムのセットアップ

本章では CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon リアルタイム PCR 解析システムのセットアップに関する情報を示します。

1. CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch のセットアップ
2. CFX Connect のセットアップ
3. MiniOpticon のセットアップ
4. CFX Manager ソフトウェアのインストール

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch のセットアップ

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch オプティカルリアクションモジュールの梱包セットには、以下の品目が含まれます。

- オプティカルリアクションモジュール
- USB ケーブル
- CFX Manager ソフトウェアのインストール用 CD
- 取扱説明書
- システムインストール、プロトコール、プレート、データ解析および遺伝子発現解析に関する CFX Manager ソフトウェア・クイックガイド
- CFX Manager ソフトウェアチュートリアル CD

全てを開梱し、箱を保管しておくことをお勧めします。もし欠品、破損がありましたら、バイオ・ラッドまでご連絡ください。

システムの使用条件

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch 各システムを操作するにあたり、以下に記載した電源、環境およびケーブルにて使用してください。

- 入力電気条件: 100–240VAC、50–60Hz
- 室内使用: 15–31℃の環境温度、80%の最高湿度(結露しないこと)
- USB ケーブル: USB ケーブル経由でシステムをコントロールする場合、弊社が提供するシールド加工タイプの USB ケーブルをご使用ください。
  注意: 本機器の安全性および規則に関する必要条件については、iv～vii ページの「製品を安全にご使用いただくために」を参照してください。

システムについて

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch 各システムは、次の 2 品目から構成されます。

- オプティカルリアクションモジュール:このモジュールは、蛍光データを収集するオプティカルシステムと、サーマルサイクラーブロック(内部)から構成されます。
  注意:CFX96 システムおよび CFX384 システムのシリアル番号は、システムの背面に記載されています。
- C1000 ™ Touch サーマルサイクラー本体:C1000 Touch 本体には、装置単体で使用する際にシステムを操作するためのユーザー操作画面、電源スイッチとコンピュータ接続用ポート(いずれも後面)が装備されています。

図 1 CFX96 Touch システムの前面

図 2 に、CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch システムのリッドを開いた場合の各部位を示します。

図 2 CFX96 Touch システムの内部

警告！インナーリッドやブロックには触れないでください。表面が加熱されているおそれがあります。

- **ヒートプレート付きインナーリッド**
  サンプル蒸発を防止するため、ヒーターリッドによってインナーリッド上部の温度を維持します。ヒートプレートには触れないでください。接触によってヒートプレートにコンタミが生じるおそれがあります。また、このプレート穴をふさがないでください。こうしたプレート穴の存在によって、シャトルシステムから蛍光データを収集することが可能となるためです。
- **ブロック**:PCR を実行する前にブロック内にサンプルを挿入します。
- **クローズボタン**:リッド内部にあるボタンを押すと、電動リッドが閉まります。
  警告！サンプル液などの流出によるコンタミを避けてください。また、サンプルチューブが開封された状態や液漏れしている状態で、本機器を作動させないでください。本品のクリーニングおよびメンテナンス方法については、「機器メンテナンス」(168 ページ)を

参照してください。

C1000 本体の後面パネルには、以下の外観的特長がみられます(図 3 参照)。

- **電源スイッチ**:スイッチを押すと、システムに電源が入ります。
- **電源入力ポート**:電源コードを接続します。
- **イーサネット用ポート**:イーサネットケーブルを接続し、ランデータや本体保存データファイルを E メール通信します。
- **USB 接続ポート**:CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch 各システムをコンピュータまたは S1000 サーマルサイクラーと接続する場合に使用します。

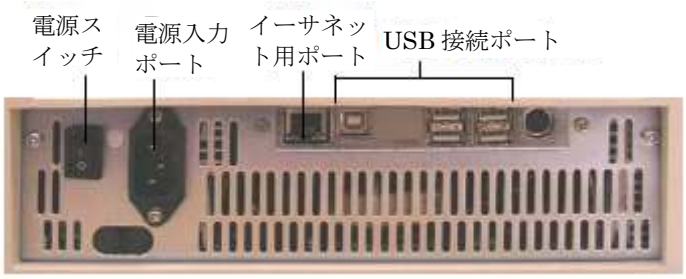


図 3 C1000 Touch サーマルサイクラーの後面パネル

警告！ 操作中には、本体の後面パネルに触れないでください。

システムのセットアップ

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch リアルタイム PCR 解析システムは、清潔で水気のない水平な場所に設置し、本品を操作する際に冷却用の空気が十分に循環されるように配置してください。各システムは、単独使用モードまたはソフトウェア制御モードのいずれかのモードで操作することができます。ソフトウェア制御モードで操作する場合は、セットアップ時にコンピュータを設置する場所を確保してください。

以下の手順により、 C1000 Touch 本体モジュールベイに CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX384 Touch オプティカルリアクションモジュールを取り付けてください。

1. ロックバーを下げた状態で、安定した場所に C1000 本体を設置します。すでにセットしたリアクションモジュールは一度本体から取り外します。
2. 両側通気フィン上のハンドルに手をかけて、オプティカルリアクションモジュールを持ち上げます (図 4)。

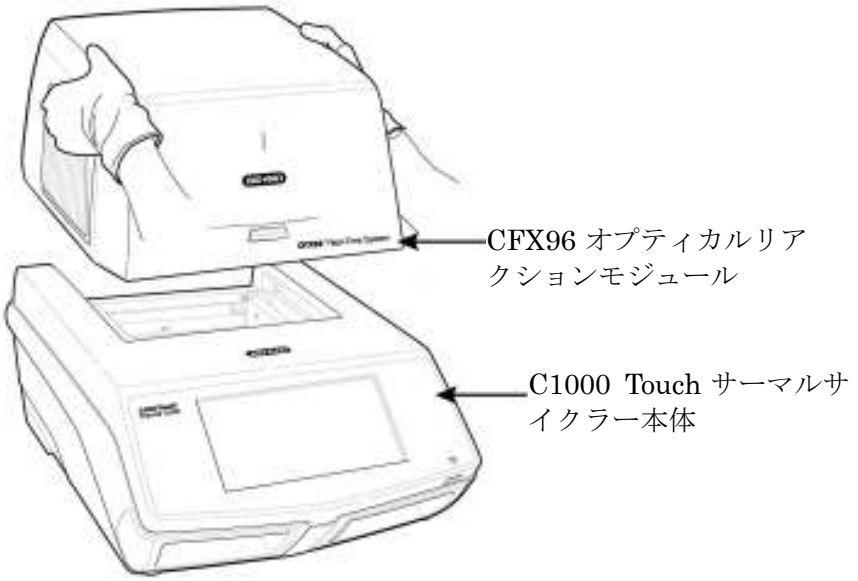


図 4 C1000 Touch 本体上でオプティカルリアクションモジュールを持ち上げたところ

3. C1000 Touch 本体モジュールベイにモジュールを静置し、前方に約 2cm のスペースを取ります。オプティカルモジュールを本体モジュールベイ内にセットする際には、本体ベイの前部にあるバイオ・ラッド社のロゴマークが隠れるようにします。
4. 本体の後ろ側に手を回して、C1000 Touch 本体モジュールベイ側面が面一になるまでロックバーを引き上げます。この動作によってモジュールが前方に移動し、静止位置で固定されます(図 5)。

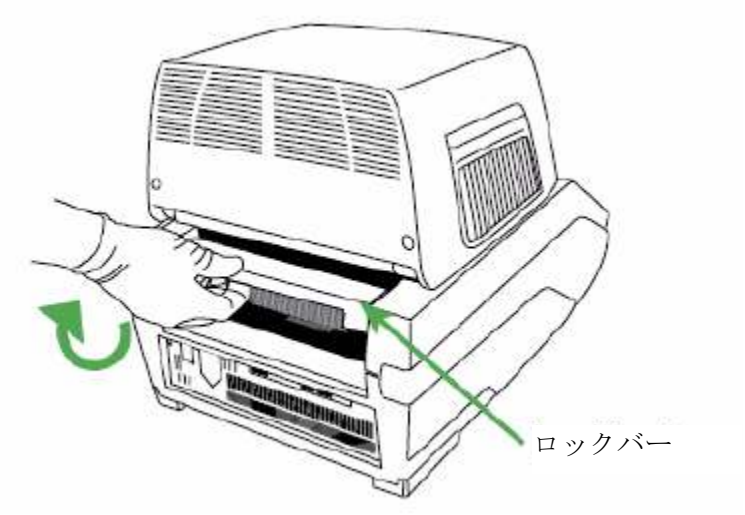


図 5 オプティカルモジュールの静止位置でロックするところ

5. モジュールが C1000 Touch 本体にずれなく確実にセットされていることを確認します。図 6 のとおり、モジュール底面のすき間の状態をチェックします。その場合、モジュールと本体の間に余分なすき間が生じておらず、均一な状態になければなりません。
6. C1000 本体の後面に電源コードを接続し（図 3 参照）、外部のアース端子付きコンセントに接続します。
7. 同本体の後面の電源スイッチを押してシステムを始動します。
8. 本体画面に表示された説明にしたがって、インナーヒーターリッドから赤色の運搬用ネジをはずします。
   ・Bio-Rad ロゴ下のボタンを押してオプティカルモジュールを開く
   ・CFX96 モジュールでは A1 ウェルにあたる場所、CFX384 では B1 ウェルの左横に位置する場所のインナーヒートリッドの穴からネジを反時計回りに回転させて、穴から抜きます。
9. サーマルサイクラーブロックから固定用プレートを取り外します。
10. ブロックの前面にあるボタンを押して、オプティカルモジュールのリッドを閉じます。
11. 運搬用ネジがはずされたことを確認する Screw Removed ボタンを押します。
    注意: この段階で運搬用ネジがはずされていない場合、CFX Manager ソフトウェアによってその状態が検出されます。その場合ネジをはずすための指示に従ってください（23 ページ）。
    アドバイス: 運搬用ネジはモジュールを出荷するときにセットする必要があります。将来の運搬に備えて、安全な場所に保管しておいてください。

CFX Connect リアルタイム PCR システムのセットアップ

1. 各部名称

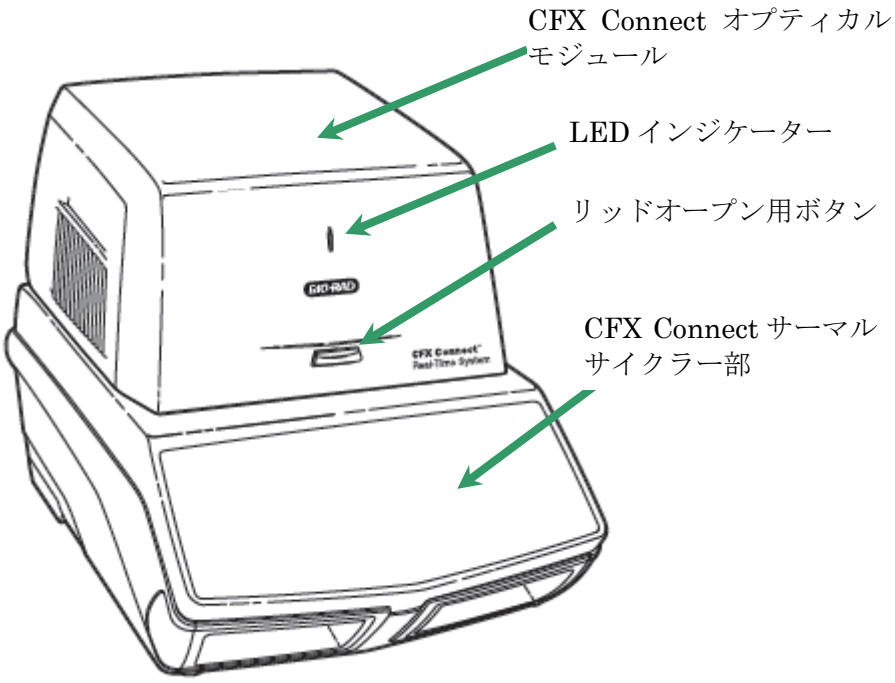


図 6 CFX Connect 本体前面

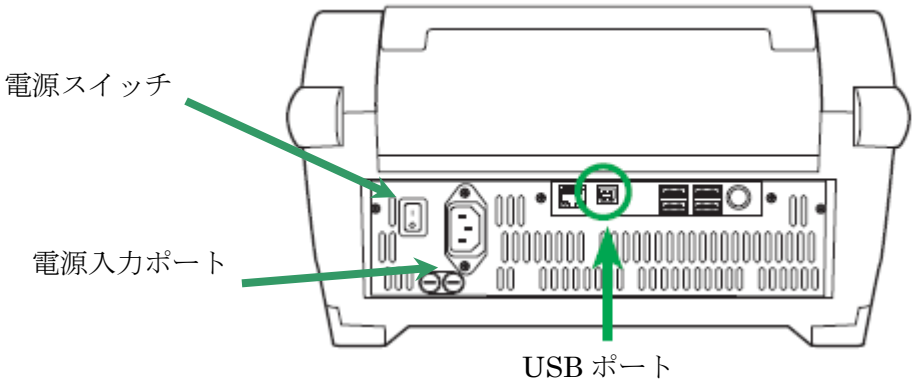


図7 CFX Connect 本体背面

2. CFX Connect リアルタイム PCR システムのセットアップ

1. ロックバーを下げた状態で、安定した場所に CFX Connect サーマルサイクラー部を設置します。
2. 下左図のように、両側通気フィン上のホルダーに手をかけて、オプティカルリアクションモジュールを持ち上げ、サーマルサイクラー部のモジュールベイにモジュールを静置し、前方に約 2cm のスペースを取ります。
3. 下右図のように、本体の後ろ側に手を回して、サーマルサイクラー部モジュールベイ側面が面一になるまでロックバーを引き上げます。
4. 本体背面に電源コードを接続し、外部のアース端子付きコンセントに接続します。
5. 同本体の後面の電源スイッチを押してシステムを始動します。
6. 同本体の後面の USB ポートとコンピュータの USB ポートを接続します。

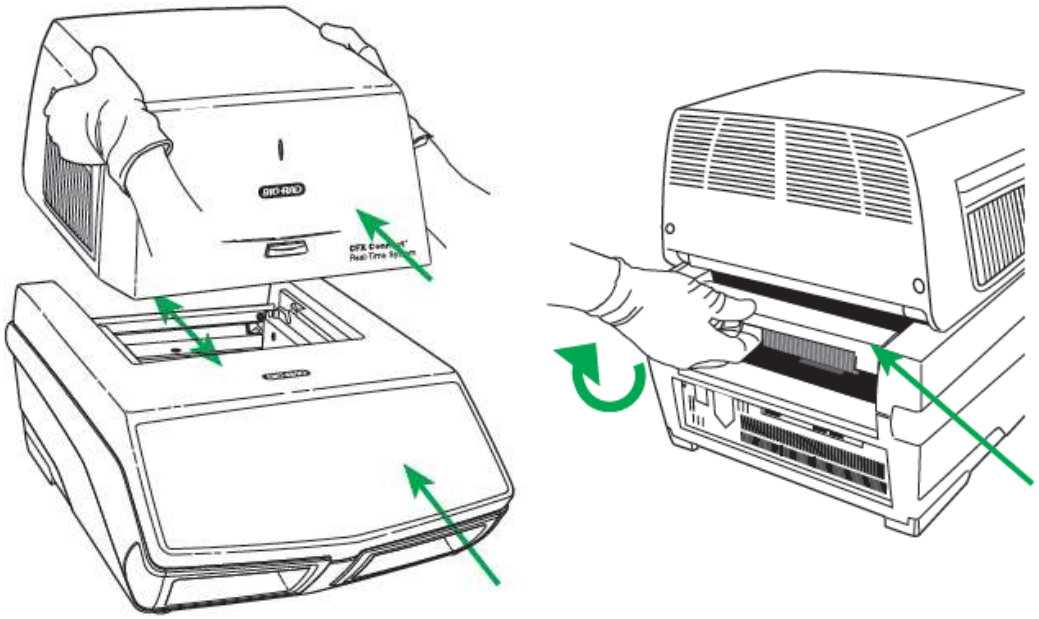


図 8 CFX Connect のセットアップ

ソフトウェアのインストール

CFX Manager ソフトウェアのインストールは 11-12 ページを参照してください。

運搬用ネジの取り外し

23-24 ページを参照して、CFX Connect のリッドに取り付けてある運搬用ネジを取り外してください。またブロックから固定用プレートも取り外します。

CFX Connect システムの操作

CFX Connect システムの操作はすべてコンピュータの CFX Manager から行います。基本的な操作方法は CFX96 Touch システムと同様です。
注意:CFX Connect システムではスタンドアローンモードは使用できません。

Scan Mode

CFX Connect システムは CFX96 Touch システムと同様に、All Channels、SYBR/FAM Only、そして FRET モードがあります。All Channels モードでは CFX Connect システムでは 1-2 チャンネルでの励起・検出となります。(53 ページ)。

推奨消耗品

CFX Connect システムの推奨消耗品は CFX96 Touch システムと同様です。

MiniOpticon リアルタイム PCR システムのセットアップ

1. 各部名称

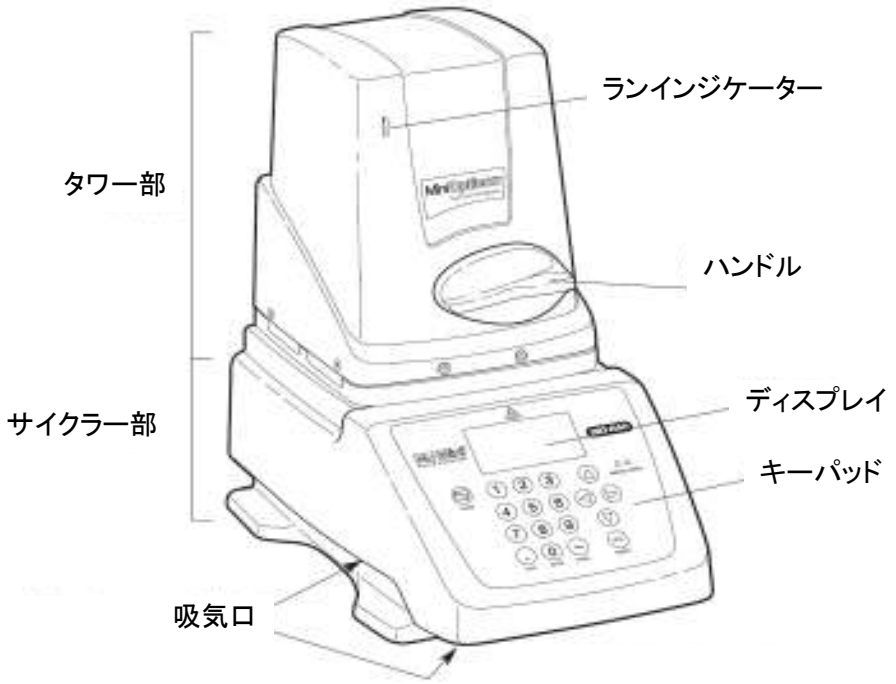


図 9 MiniOpticon 本体正面図

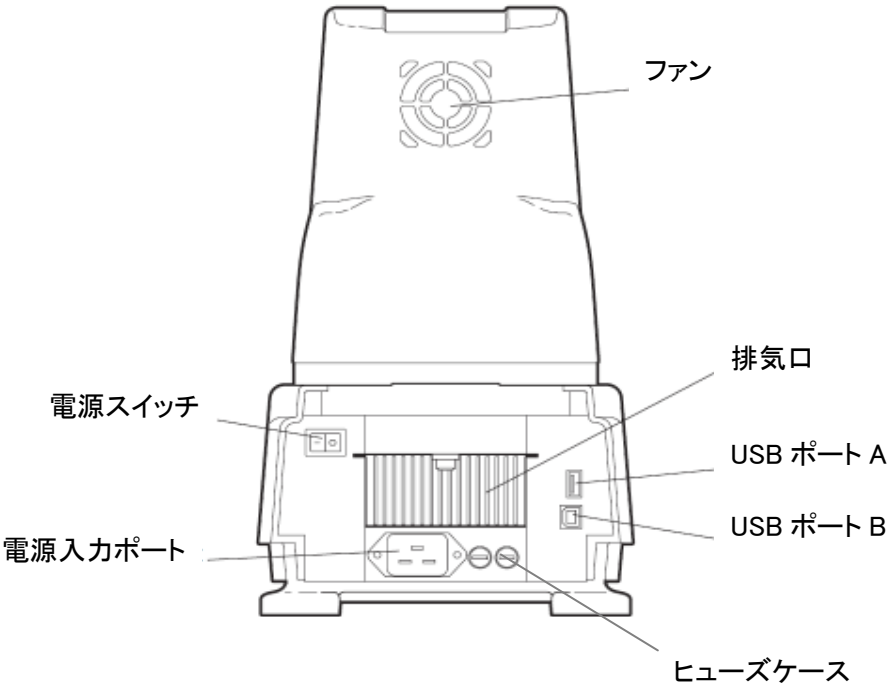


図 10 MiniOpticon 本体背面図

2. MiniOpticon リアルタイム PCR システムのセットアップ

開梱時、緑色のハンドルを持って装置を持ち上げないでください。MiniOpticon は下からしっかりと装置の両側を持ってください。

USB ケーブルと電源コードの接続

1. 電源コードを機器背面の電源入力ポートに差し込み、コンセントに接続してください。
2. USB ケーブルを機器背面の USB ポート B(2 つある USB ポートの下側)へ差し込みます。もう一方の端をコンピュータの USB ポートへ差し込んでください。

ソフトウェアのインストール

CFX Manager ソフトウェアのインストールは 11-12 ページを参照してください。MiniOpticon では2つの USB ドライバのインストールが必要です。

MiniOpticon システムの起動

MiniOpticon 本体の電源スイッチは機器背面の右側にあります。本体は電源を入れてからウォームアップに数分間要します。CFX Managerソフトウェアを起動する前に、必ずMiniOpticonユニットとコンピュータが接続され、電源が入っていることを確認してください。CFX Manager ソフトウェアを起動します。Detected Instrument ペインに接続された MiniOpticon のアイコンが表示されれば、正常に接続できたことを示します。

MiniOpticon システムのシャットダウン

完全にランが終了していることを確認してから、CFX Manager ソフトウェアを終了させてください。CFX Manager ソフトウェアを閉じてから、MiniOpticon 本体の電源を切ってください。

MiniOpticon リッドの開閉

MiniOpticon のサンプルブロックを開くには、装置正面にある緑色のハンドルを反時計回りに回します。タワー部全体を左側(外側)に回転させます。
MiniOpticon を閉じるにはタワー部を回転させて元の位置に戻し、緑色のハンドルを時計回りに回してください。
注意:緑色のインジケーターが点灯している時は MiniOpticon を開けないでください。プレート読込み中に開けるとプロトコルコントロールが妨害されます。

推奨消耗品

- MLL-4851:Low-profile 48well Multiplate プレート、ホワイト
- TLS-0851:Low 0.2 ml 8 連チューブ、ホワイト
- TCS-0803:Optical 8 連フラットキャップ、0.2 ml チューブおよびプレート用

反応液量

MiniOpticon での反応液量は 20-50 μl を推奨しています。設定可能な反応液量は 1-50 μl です。

Startup Wizard

Run setup でポップアップメニューから MiniOpticon を選択してください(21 ページ)。

プレートサイズ&タイプ

Plate size では 48 Wells を選択して、Plate type では Opticon Monitor ソフトウェアからアップグレードされたシステムでは MJ White を、新しいシステムでは BR White を選択してください(53 ページ)。

Scan Mode

MiniOpticon は 2 チャンネルで蛍光色素を励起し、検出することができます。Plate Editor ウインドウのツールバーにある以下の Scan Mode は MiniOpticon では All Channels のみ使用可能です(53 ページ)。

その他の注意事項

MiniOpticon システムはスタンドアローンモードでの使用はできません。

CFX Manager ソフトウェアのインストール

CFX Manager ソフトウェアは、Windows XP, Windows Vista, Windows 7 のいずれかの OS を使用するコンピュータ上で操作することができます。このソフトウェアにより、CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch, MiniOpticon リアルタイム PCR 解析システムから得られたリアルタイム PCR データを解析します。また、ソフトウェア制御モードで各リアルタイム PCR 解析システムを管理する場合にも使用します。表 6 に、Windows XP および Windows Vista を OS とするコンピュータで本ソフトウェアを使用する場合の動作条件を示します。

表 6 CFX Manager ソフトウェアに関するコンピュータの動作環境

システム	最低動作条件	推奨動作条件
オペレーティングシステム	Windows XP Professional SP2 以上、Windows Vista Home Premium 以上、または Windows 7 Home Premium 以上	Windows XP Professional SP2 以上または Windows 7
ドライブ	CD-ROM ドライブ	CD-RW ドライブ
ハードディスク	10 GB	20 GB 以上
CPU	2.0 GHz	2.0 GHz 以上
メモリ	1 GB RAM (Windows Vista の場合は 2 GB)	2 GB RAM
ディスプレイ	1024 x 768 ピクセル (トゥルーカラーモード)	1280 x 1024 ピクセル (トゥルーカラーモード)
USB	USB 2.0 (高速ポート)	USB 2.0 (高速ポート)

以下の手順にて、CFX Manager ソフトウェアをインストールしてください。

1. コンピュータからリアルタイム PCR 装置の接続を解除しておいてください。
2. 本ソフトウェアは、管理者権限をもつユーザーがコンピュータにインストールしてください。管理者権限によってログインしていることを確認してください。
3. コンピュータ CD ドライブに CFX Manager ソフトウェア CD-ROM をセットします。
4. ソフトウェア起動ページが自動的に表示されます。このページの Install Software ボタンをダブルクリックします (図 11)。
   アドバイス: Documentation ボタンをクリックすると、本品の取扱説明書やその他文書の PDF ファイルを確認することができます。
5. 画面の説明にしたがってインストールを完了します。インストールが完了すれば、コンピュータのデスクトップに Bio-Rad CFX Manager というアイコンが表示されます。
6. ソフトウェア起動ページが自動表示されない場合は、(CD drive):¥Bio-Rad CFX をダブルクリックします。続いて Readme.txt ファイルを開き、その記載事項に従って操作してください。171 ページの「ソフトウェアの手動インストール」を参照してください。

図 11 ソフトウェアインストール画面

ドライバのインストール

各リアルタイム PCR 解析システムをソフトウェア制御モードで使用する場合には、コンピュータにあらかじめドライバをインストールする必要があります。その際は、付属の USB ケーブルを必ず使用してください。このケーブルは、データロスを予防できるようシールド加工されています。

以下の手順によりシステムドライバをインストールしてください。

1. サーマルサイクラー本体の後面の USB2.0 A ポート(図 3)とコンピュータ側の USB B ポートにそれぞれ USB ケーブルのソケットを差し込み、両者を接続します。
2. 電源を入れていない場合は、サーマルサイクラー本体の後面にある電源スイッチを ON にします。
3. コンピュータによって装置が最初に認識されると"Found New Hardware Wizard"(新しいハードウェアウィザードを探す)が表示されますので、その表示にしたがって操作してください。表示される全てのデフォルトのオプション(選択肢)を選択していきます。
   注意: もし Detected Instrument(s)ペインにリアルタイム PCR 装置が表示されない場合、USB 接続が正しいかどうかを確認して、メインソフトウェアウインドウのメニューバーから Tools > Reinstall Instrument Drivers を選択してドライバを再インストールします。

注意:MiniOpticon ではドライバーを2つインストールする必要があります。インストールの詳細は英文取扱説明書をご参照ください。

ソフトウェアファイル

CFX Manager ソフトウェアで特有のファイルでランに関わる情報を示します(表 7)。

表 7 CFX Manager ソフトウェアで開くことができるファイル

ファイルタイプ	拡張子	ファイル閲覧および編集方法
Protocol	**.prcl**	**Run Setup で選択、Protocol Editor で編集**
Plate	**.pltd**	**Run Setup で選択、Plate Editor で編集**
Data	**.pcrd**	**Data Analysis ウインドウで閲覧および解析**
PrimePCR Run	.csv	PrimePCR プレート用のプロトコールとプレートレイアウト情報を含む
Gene Study	.mgxd	Gene Study ウインドウで閲覧および解析
Stand-alone pre-data file	.zpcr	スタンドアローンによる取得した蛍光データを含んでおり、データファイルに変換可能

LIMS	.plrn	LIMS 準拠のランを処理するのに必要なプレート設定、プロトコール情報を含む

実験の実行

推奨プラスチック消耗品

最適な結果を得るために、CFX384 Touch システム専用品として以下の消耗品のご使用を推奨します(カタログ番号は太字で表示)。

- **HSP-3805**:384well Hard-Shell プレート、透明シェルおよび白色ウェル
- **HSP-3865**:384well Hard-Shell プレート、黒色シェルおよび白色ウェル
- **MSB-1001**:Microseal B フィルム

CFX96 Touch 並びに CFX Connect システムでは、ロープロファイルの 0.2 ml プレートおよびチューブに対応します。最適な結果を得るために、以下の消耗品のご使用を推奨します。

- **MLL-9601**:Low-profile 96well Multiplate プレート、ナチュラル
- **MLL-9651**:Low-profile 96well Multiplate プレート、ホワイト
- **HSP-9601**:Hard-Shell 96well skirted プレート、白色シェルおよび透明ウェル
- **HSP-9655**:Hard-Shell 96well skirted プレート、白色シェルおよび白色ウェル
- **TLS-0801**:Low 0.2 ml 8 連チューブ、ナチュラル
- **TLS-0851**:Low 0.2 ml 8 連チューブ、ホワイト
- **TCS-0803**:Optical 8 連フラットキャップ、0.2 ml チューブおよびプレート用
- **MSB-1001**:Microseal B フィルム

CFX96 Touch Deep Well システムでは、ロープロファイル並びに標準高の 0.2 ml プレートおよびチューブに対応します。最適な結果を得るために、以下の消耗品のご使用を推奨します。

- **MLL-9601**:Low-profile 96well Multiplate プレート、ナチュラル
- **MLL-9651**:Low-profile 96well Multiplate プレート、ホワイト
- **HSP-9601**:Hard-Shell 96well skirted プレート、白色シェルおよび透明ウェル
- **HSP-9655**:Hard-Shell 96well skirted プレート、白色シェルおよび白色ウェル
- **HSS-9601:**Hard-Shell 96well セミスカート PCR プレート、透明シェルおよび透明ウェル
- **HSS-9641:**Hard-Shell 96well セミスカート PCR プレート、緑色シェルおよび透明ウェル
- **TLS-0801**:Low 0.2 ml 8 連チューブ、ナチュラル
- **TLS-0851**:Low 0.2 ml 8 連チューブ、ホワイト
- **TBS-0201**:0.2ml thin-wall 8 連チューブ、ナチュラル
- **TCS-0803**:Optical 8 連フラットキャップ、0.2 ml チューブおよびプレート用
- **MSB-1001**:Microseal B フィルム

MiniOpticon リアルタイム PCR 解析システムでは、ロープロファイル並びに標準高の 0.2 ml プレートおよびチューブに対応します。最適な結果を得るために、以下の消耗品のご使用を推奨します。

- **MLL-4851:**Low-profile 48well Multiplate プレート、ホワイト
- **TLS-0851:**Low 0.2 ml 8 連チューブ、ホワイト
- **TCS-0803:**Optical 8 連フラットキャップ、0.2 ml チューブおよびプレート用

ブロックへのローディング

～CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well,CFX Connect, CFX384 Touch の場合

以下の手順により、ブロック内にプレートおよびチューブをセットしてください。

- 電動リッドを開くには、ソフトウェア Start Run タブにある **Open Lid** をクリックするか(34 ページの「スタートランタブ」を参照)、システム前面のリッドボタンを押します(図 1)。
- ブロック内にあらかじめシーリングされた 0.2 mL マイクロプレートまたはチューブストリップをセットします。液漏れを防ぐためチューブのフタがしっかり閉じられていることを確認してください。実験データが適正に得られるサンプル容量の範囲は、CFX96 Touch 並びに CFX Connect システムでは 10～25 μL、CFX96 Touch Deep Well システムでは

25～100 μL、CFX384 Touch システムでは 5～20 μL となります。
注意:データ解析の精度を保持するため、ブロック内のリアクション配列が、ソフトウェア画面に表示されるプレートタブの各ウェルの配列と同じであることを確認してください（33 ページ「プレートタブ」参照）。必要に応じて、ランの実行時または終了後にウェル配列を修正します。各ウェル内容に間違いがあっても、そのままの状態で蛍光データが保存されてしまうためです。

警告！ウェル内のチューブストリップまたはカットしたマイクロプレートは、常に左右上下のバランスを保ってください（図 12）。たとえば、ブロック左側に 1 列のストリップチューブを使用する場合には、ヒートリッドによって適用される圧力のバランスを取るため、ブロック右側に 1 列の空のチューブストリップ（キャップ付）のランを行います。

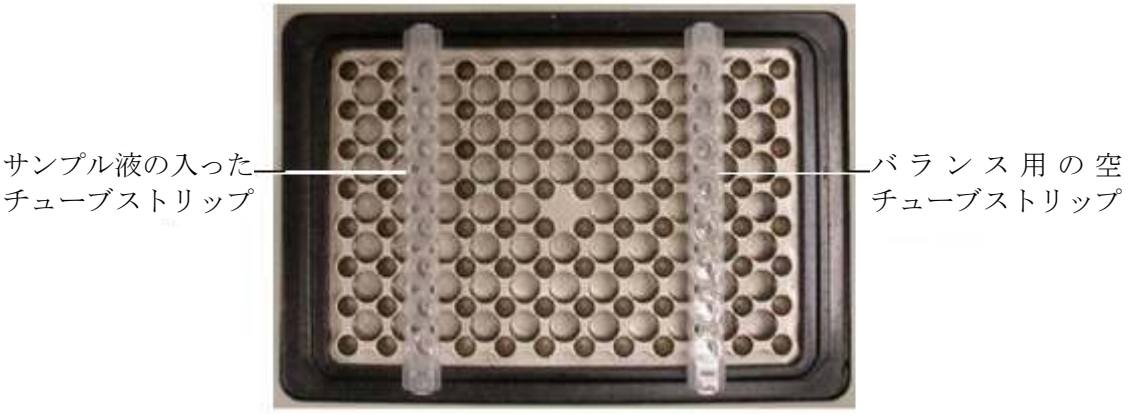


図 12 ブロック内でのチューブストリップまたはカットしたマイクロプレートのバランス

警告！電動リッドを閉じる前に、障害となる物がないかどうか確認してください。障害物が感知されると電動リッドの安全機能によってその動作が停止しますが、リッドを閉じる際には障害となるようなものを置かないでください。

ブロックへのローディング～MiniOpticon の場合

CFX Manager ソフトウェアを起動する前に、MiniOpticon システムがコンピュータに接続されており、本体電源がオンになっていることを確認してください。MiniOpticon 前面にある緑色のランプはプロトコール実行中に点灯します。

警告！MiniOpticon を使用する前にサーマルサイクラーブロックから出荷時にセットされたプレートを取り外してください。

1. MiniOpticon･システムのブロックにアクセスするには、反時計回りに正面緑のハンドルを回します。ブロックが完全に見えるようになるまで、左にオプティカルタワー全体を回転させます。
2. シールされた 48well プレート、0.2ml チューブもしくはストリップチューブをブロックにセットします。チューブからの蒸発等を防ぐため、完全に密封されていることを確認してください。MiniOpticon システムで最適な結果を得るために、サンプル容量は 15～30 μl の範囲で行なって下さい。
3. サンプルへの均一な加熱と冷却を確保するために、サンプルチューブとブロックの密着は完全でなければなりません
   - サンプルをセットする前にサンプルブロックに汚れがないことを確認してください。
   - しっかりとサンプルブロックにチューブまたは 48well マイクロプレートをセットします。

   参考情報:サーマルサイクラーにサンプルをロードする前にチューブまたはマイクロプレートを遠心してください。サンプル中の気泡やプレートのデッキ部分に残っ

たサンプルが結果に影響を与えることがあります。

- バイオ・ラッドではサンプル容器とサンプルブロックの間にオイルを使わないことを強く推奨します。

注意：MiniOpticon 本体の緑色 LED が点灯中は MiniOpticon 検出器を開けないでください。特にプレートのスキャン時に、ドアを開けた場合には、ソフトウェアはプロトコールの制御を中断します。

4. ドアを閉じるには、オプティカルタワーを正面へ戻してから、電源を入れ緑色のハンドルを時計回りに回します。開閉を容易にするため、オプティカルタワーとハンドルの両方にスプリングが内蔵されています。

注意：正確なデータ分析のために、プレートの向きを確認してください。ソフトウェアでのプレート表示は MiniOpticon 本体と同じ向きに表示されます。Plate タブ（33 ページの ″Plate タブ″を参照してください）。必要があれば、Plate 設定をよく内容を確認してラン前、ラン中、ラン後にプレート設定を編集してください。

警告！ MiniOpticon･システムを実行する際には、必ずチューブ、ストリップのバランスを取って下さい。例えば、1 つのチューブストリップのランを実行する場合、ブロックの左端に入れ、ブロックの右端に空のチューブストリップ（キャップ付）を置いてランを実行してください。これにより、ヒートリッドによる圧力を均衡させることができます。

警告！ MiniOpticon の緑ハンドルを回して、閉じる際には Lid に干渉するものが何もないことを確認してください。

システムのシャットダウン

以下の手順により、各リアルタイム PCR 解析システムをシャットダウンしてください。

CFX96 Touch, CFX96 Touch Deep Well, CFX Connect, CFX384 Touch システム

- ランの後、サーマルサイクラーブロックにロードされているサンプルにアクセスするためにオプティカルモジュール前面のリッド開ボタンを押します。
- ブロックからサンプルを取り除き、リッドを閉じるためにリッド閉ボタンを押します。

システムの電源を切るために、サーマルサイクラーの背面にある電源スイッチを押します。

MiniOpticon システム

- ランの後、サーマルサイクラーブロックにロードされているサンプルにアクセスするため反時計回りに正面緑のハンドルを回します。ブロックが完全に見えるようになるまで、左にオプティカルタワー全体を回転させます。
- ブロックからサンプルを取り除き、リッドを閉じるためにオプティカルタワーを右方向へ回し、緑ハンドルが正面に来るようにします。時計回りに正面緑のハンドルを回します。

システムの電源を切るために、サーマルサイクラーの背面にある電源スイッチを押します。

第 2 章－CFX Manager ソフトウェア

2 CFX Manager ソフトウェア

本章では、CFX Manager ソフトウェアの操作開始に関する項目について解説します。

- メインソフトウェアウインドウ(18 ページ)
- Startup Wizard(21 ページ)
- Detected Instruments ペイン(21 ページ)
- ステータスバー(22 ページ)
- Instrument Propeties ウインドウ(22 ページ)
- Master Mix Calculator(25 ページ)
- Scheduler(26 ページ)

メインソフトウェアウインドウ

メインソフトウェアウインドウで利用可能な機能を図 13 に示します。

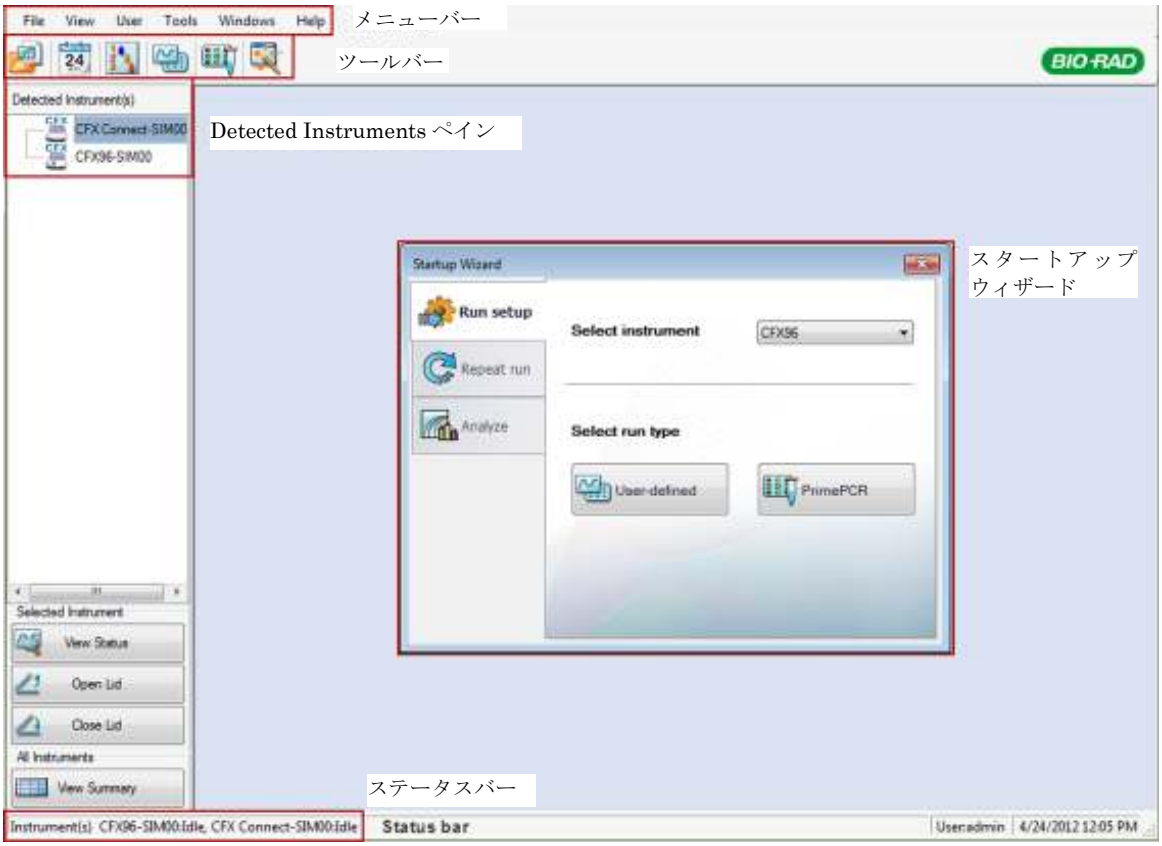


図 13 メインソフトウェアウインドウ

メニューバー

メインソフトウェアウインドウのメニューバーの各コマンド機能を選択します（表 8）。

表 8 メインソフトウェアウインドウのメニューバー項目

メニュー項目	コマンド	機能内容
File	New	Protocol、Plate、Run または Gene Study のファイルを新たに作成する。
	Open	Protocol（.prcl）、Plate（.pltd）、データ（.pcrd）および Gene Study（.mgxd）、スタンドアローンランファイル（.zpcr）の各既存ファイルを開く。
	Recent Data File	最近開いたデータファイルを 10 件まとめて表示し、Data Analysis ウインドウ上に開くファイルを選択する。
	Repeat an Run	速やかにランを繰り返すため、完了済みのランからのプロトコールおよびプレートを示したランセットアップウィンドウを開く。
	Exit	ソフトウェアプログラムを終了する。

表 8 メインソフトウェアウインドウのメニューバー項目（続き）

メニュー項目	コマンド	機能内容
View	Application Log	ソフトウェア用のアプリケーションログを表示する。
	Run Reports	ランレポートをまとめて表示し、希望するレポートを選択する。
	Startup Wizard	Startup Wizard を開く。
	Run Setup	Run Setup ウインドウを開く。
	Instrument Summary	Instrument Summary ウインドウを開く。
	Detected Instruments	Detected Instruments ペインを表示または非表示にする。
	Toolbar	メインソフトウェアウインドウのツールバーを表示または非表示にする。
	Status Bar	メインソフトウェアウインドウのステータスバーを表示または非表示にする。
User	Select User	Select User ウインドウを開き、ソフトウェアユーザーを変更する。
	Change Password	ユーザーパスワードを変更する。
	User Preferences	User Preferences ウインドウを開く。
	User Administration	User Administration ウインドウを開く。
Tool	Scheduler	機器の使用予定を入力する Scheduler を開く。
	Master Mix Calculator	Maseter Mix Calculator を開く。
	Protocol AutoWriter	Protocol AutoWriter ウインドウを開き、新たにプロトコールを作成する。
	Ta Calculator	Ta Calculator ウインドウを開き、プライマーのアニーリング温度を計算する。
	Dye Calibration Wizard	Dye Calibration Wizard ウインドウを開き、新しく使用する蛍光色素の校正を行う。
	Reinstall Instrument Drivers	リアルタイム PCR システムとの通信をコントロールするドライバを再インストールする。
	ZIP Data and Log Files	データ保存または E メール送信するために ZIP ファイル内からファイルを選択し、圧縮する。
	Options	ソフトウェア E メールおよび LIMS を設定する。
Windows	Cascade	各上部にソフトウェアウインドウを配置する。
	Tile Vertical	ソフトウェアウインドウを上下に配置する。
	Tile Horizontal	ソフトウェアウインドウを左右に配置する。
	Close All	開いているウインドウをすべて閉じる。

表 8 メインソフトウェアウインドウのメニューバー項目（続き）

メニュー項目	コマンド	機能内容
Help	Contents	ヘルプを開き、PCR およびリアルタイム PCR に関する情報を得る。
	Index	ヘルプの目次を表示する。
	Search	ヘルプの情報を検索する。
	qPCR Applications & Tehcnologies Web Site	リアルタイム PCR に関するウェブサイトから情報を得る。
	PCR Reagents Web Site	PCR およびリアルタイム PCR 用試薬に関するウェブサイトから情報を得る。
	PCR Plastic Consumables Web Site	PCR およびリアルタイム PCR 用消耗品に関するウェブサイトから情報を得る。
	Check For Updates	ソフトウェア更新データの有無をチェックする。
	About	ソフトウェアバージョンを示すウインドウを開く。

ツールバーボタン

メインソフトウェアウインドウのツールバーにあるボタン（表 9）を押すことにより、使用頻度の高いコマンド機能に直接アクセスすることができます。

表 9 メインソフトウェアウインドウのツールバーボタン

ボタン	名称	機能内容
	Open a Data File	データファイル（*.pcrd 拡張子）が存在するブラウザウインドウを開き、さらに Data Analysis ウインドウ内にそのウインドウを開く（79 ページ）。
	Scheduler	PCR 機器の予約するための Scheduler を開く。
	Master Mix Calculator	反応試薬の調製の計算するための Master Mix Calculator ウインドウを開く。
	User-defined Run Setup	ランの設定を行う Run Setup ウインドウを開く。
	PrimePCR Run Setup	PrimerPCR 用のプロトコールと選んだ装置に合わえたレイアウトのプレート設定の Run Setup ウインドウを開く。
	Startup Wizard	ランの設定、ランの繰り返し、データ解析を始めるための Startup Wizard を開く。

Startup Wizard

CFX Manager ソフトウェアを初めて立ち上げると、Startup Wizard が自動的に表示されます。表示されない場合は、メインソフトウェアウインドウのツールバーにある **Startup Wizard** ボタンをクリックしてください。

Startup Wizard には、以下のソフトウェアコマンド機能が表示されます。

- **Run setup:** 使用する装置に合ったプレート設定を行うためにプルダウンリストから適切な装置を選択します。
  - **User-defined**: Run Setup ウインドウ(31 ページ)での新しくランをはじめる際のプロトコールとプレートの設定を行います。
  - **PrimePCR**: PrimePCR 用のデフォルトのプロトコールと(選択された装置の)プレートレイアウトを設定された状態の Run Setup ウインドウが開きます。PrimePCR のプレートレイアウトはラン途中でもラン終了後でも適用可能です。(国内では現在未対応)
- **Repeat Run:** 完了したランからのプロトコールとプレートレイアウトを使ってランの設定を行います。スタート前にはランの編集ができます。
- **Analyze:** 単独ランからの結果を解析するためのデータファイル(75 ページ)、もしくは複数の遺伝子発現解析ランからの結果をまとめた gene study ファイル(134 ページ)を開きます。

Detected Instruments ペイン

接続されている機器が、Detected Instruments ペインに表示されます(図 14)。このリストには、シリアル番号(初期設定)を付したアイコンとして機器が表示されます。また、C1000 または S1000 サーマルサイクラーにセットされたデュアルブロックリアクションモジュール毎にブロック(ブロック A およびブロック B)が別々に表示されます。

図 14 では、以下に示す 4 台の機器が検知されています。

- デュアル 48/48 リアクションモジュールを付属した C1000 サーマルサイクラー(C48FSIM00)
- 96-ウェルブロックを付属した S1000 サーマルサイクラー(S96FSIM01)。これには C48FSIM00 の名称が付いた C1000 サーマルサイクラーに接続されている。
- CFX384 システム(CFX384SIM03)
- CFX96 システム(CFX96SIM02)

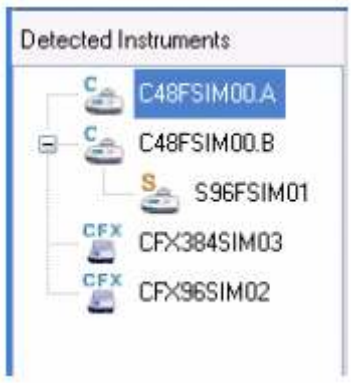


図 14 Detected Instruments ペインに表示される機器リスト

機器アイコン上で右クリックすると、以下の項目をいずれか一つ選択できます。

- **View Status**：Run Details ウインドウが開き、選択した機器ブロックの状況を確認します。
- **Flash Block Indicator**：機器ブロックを LED 点灯します。
- **Open Lid**：選択した機器ブロックの電動リッドを開きます。
- **Close Lid**：選択した機器ブロックの電動リッドを閉じます。
- **Rename** 機器の名称を変更します。
- **Properties**：Properties ウインドウを開きます。
- **Collapse All**：Detected Instruments ペイン上の機器リストのディレクトリを閉じます。
- **Expand All**：Detected Instruments ペイン上の機器リストのディレクトリを開きます。

このほか、Detected Instruments ペインの機器ブロックアイコンをクリックし、さらに Selected Instrument ペイン内にあるボタンをクリックすると、ブロックをコントロールすることができます（図 15）。

図 15 Detected Instruments ペイン下部にあるボタン

- **View Status** ボタンをクリックすると、Run Details ウインドウが開き、選択した機器ブロックの状況が表示されます。
- **Open Lid** ボタンをクリックすると、選択した機器のモニター電動リッドが開きます。
- **Close Lid** ボタンをクリックすると、選択した機器のモニター電動リッドが閉じます。
- **View Summary** ボタンをクリックすると、機器サマリーウインドウが開きます。

機器が 1 台のみソフトウェアによって検知されている場合、**View Summary** ボタンは表示されません。単一機器の Instrument Summary ウインドウを表示するには、**View > Instrument Summary** を選択してください。

ステータスバー

メインソフトウェアウインドウの底部にあるステータスバーの左側は機器の現在の状況を示しています。ステータスバーの右側はユーザー名、日付、時刻を表示しています。メインウインドウをリサイズするためにはステータスバーの右下のコーナーをクリックしてドラッグしてください。

Instrument Properties ウインドウ

Instrument Properties ウインドウを開いて機器に関する情報を表示するには、Detected Instruments ペイン（図14）にある機器アイコンを右クリックしてください。このウインドウには、以下の 3 つのタブがあります。

- **Properties**：シリアル番号および C1000 サーマルサイクラー名が表示されます。

- **Shipping Screw:** 機器を操作する際には運搬用ネジをはずし、機器を搬送する際は取り付けます。
- **Calibrated Dyes:** キャリブレーション済み蛍光色素を一覧表示します。

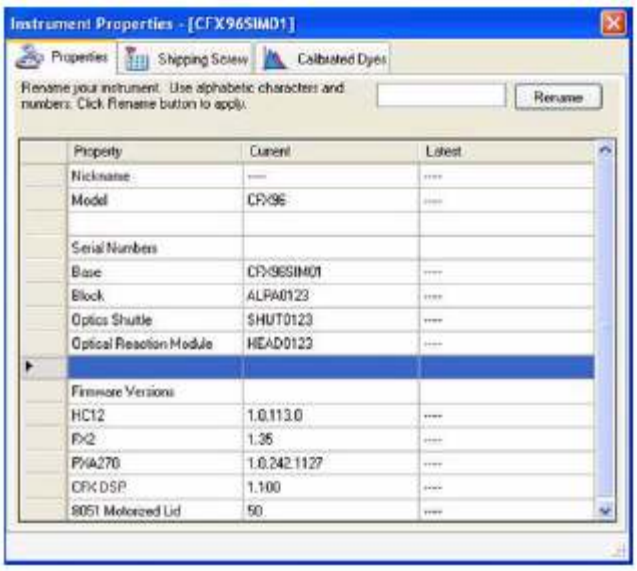


図 16 Instrument Properties ウインドウ

Properties タブ

機器の初期設定名は、C1000 Touch サーマルサイクラーのシリアル番号になります。この番号は、Detected Instruments ペイン（図 14）など、いくつかの場面で表示されます。

機器の名称を変更したい場合は、以下の手順をとってください。

- Instrument Properties タブにて、上部にある Rename 欄に希望する名称を入力した後、Rename ボタンを押して保存します。

この Instrument Properties タブでは、サーマルサイクラーやリアクションモジュールなどの接続機器のシリアル番号が表示されます。ファームウェアバージョンも表示されます。

Shipping Screw タブ

このタブ画面には、システム機器の移動時に赤い運搬用ネジの取付け・取り外し方法についての情報が表示されます。オプティカルリアクションモジュールの損傷を防ぐため、CFX96 Touch または CFX384 Touch システムを移動する際には、必ず、この運搬用ネジを取り付けてください。

注意：ソフトウェアによって運搬用ネジが検知されれば、Instrument Properties ウインドウが自動表示され、ネジに関するタブが前面に表示されます。この説明に従って、ネジを取り外してください。

この運搬用ネジが取り付けられているか、あるいは外されているかによって、タブに表示される内容が異なります。例えば、運搬用ネジを取り付ける場合には、タブ画面上の Install Shipping Screw ボタンをクリックし、表示された説明に従ってください（図 17）。

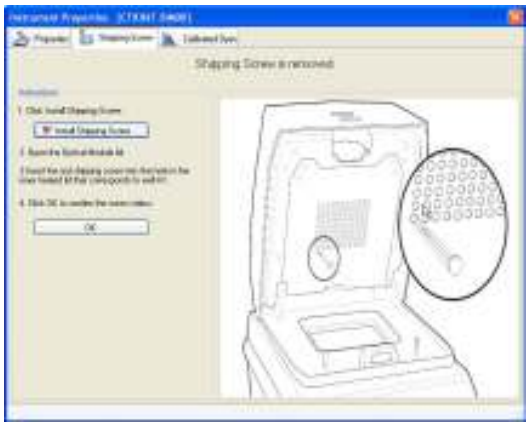


図 17 運搬用ネジ取り付けの説明画面

Calibrated Dyes タブ

Calibrated Dyes タブ（図 18）を開くと、選択された機器で使用するキャリブレーション済みの蛍光色素およびプレートが一覧表示されます。Info ボタンを押すと、キャリブレーションに関する詳しい情報が表示されます。

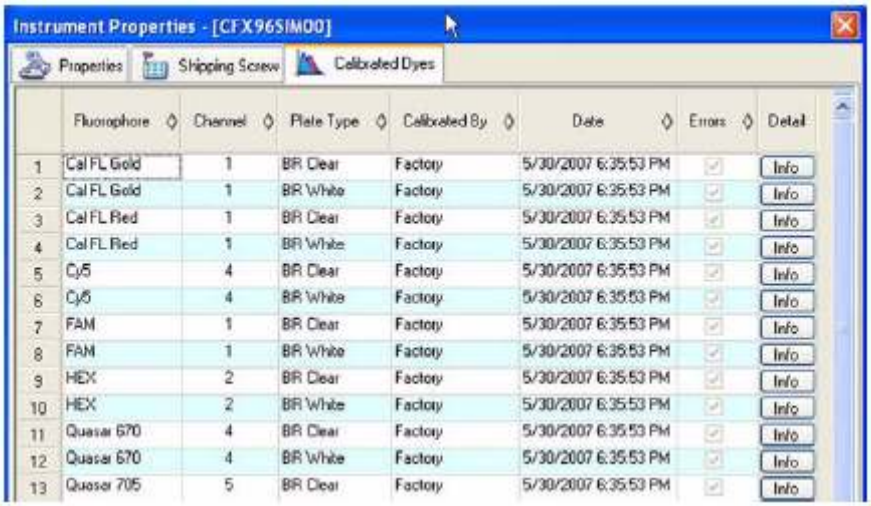


図 18 Instrument Properties ウインドウの Calibrated Dyes タブ

Master Mix Calculator

Master Mix Calculator を呼び出すためには、ツールバー(表 9)にある Master Mix Calculator ボタンをクリックするか、メインウインドウで **Tools > Master Mix Calculator** を選択します。

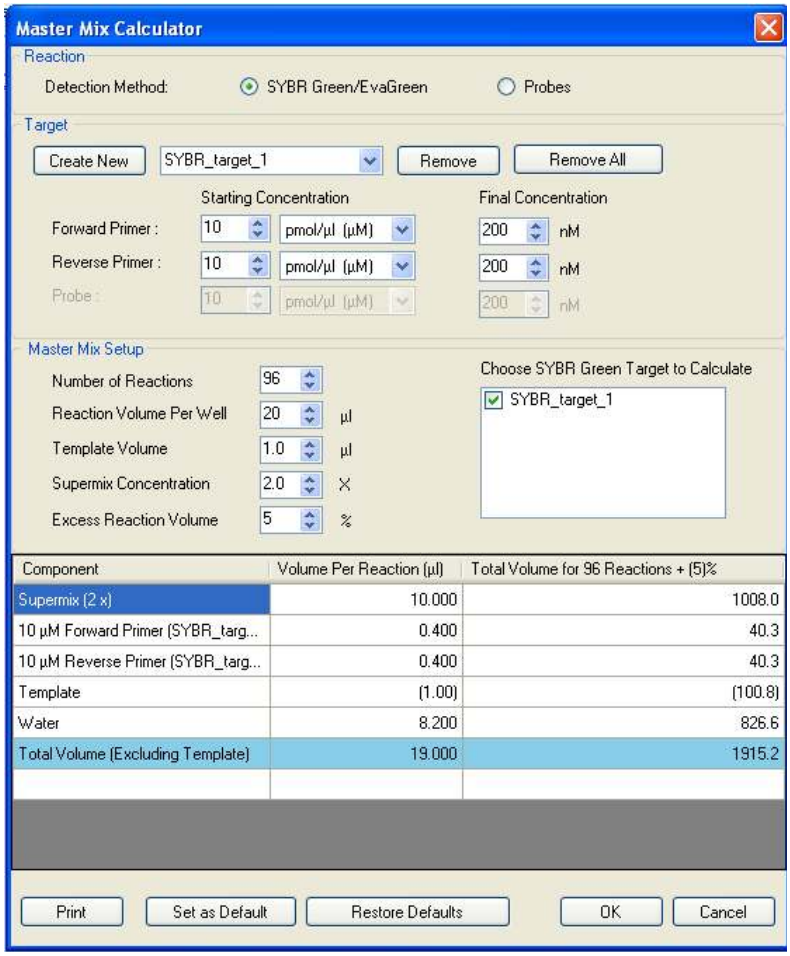


図 19 Master Mix Calculator ウインドウ

マスターミックス反応液の調製を計算するには:

1. SYBR Green/EvaGreen 系または Probes 検出系を選択します。
2. ドロップダウンのターゲットリストからターゲット名をハイライトさせる、**Target** ボックスに新しいターゲット名に入力して、キーボードの Enter キーを押して、デフォルトのターゲット名を編集します。
3. フォワードプライマー、リバースプライマーとプローブの初期と最終濃度を入力します。
4. ターゲットを追加する場合、**New** ボタンをクリックします。ターゲットを消去するには、ドロップダウンのターゲットリストを使ってターゲットを選択して **Remove** をクリックします。

警告！ターゲットリストからターゲットを削除すると、使用していたマスターミックス計算からもそれが削除されます。

5. Supermix 濃度（Supermix Concentration）、1 ウェルあたりの反応液量（Reaction Volume Per Well）、余剰反応液量（Excess Reaction Volume）、各ウェルにくわえるテンプレート液量（Template Volume）そしてランする反応数（Number of Reactions）を入力します。
6. 次のターゲットのチェックボックスをチェックします（SYBR Green/EvaGreen 系ではターゲットはひとつのみ選択、Probes 系では複数のターゲットを選択可）。マスターミックスに必要な各構成の計算された溶液量がリスト化されます。
7. マスターミックス計算表をプリントするには、**Print** をクリックします。
8. **Set as Default** ボタンをクリックすると、現在表示されている Target と Master Mix Setup の値が新しいデフォルト値としてセットされます。
9. **OK** ボタンをクリックすると、Master Mix Calculator ウインドウをの内容が保存されます。

Scheduler

機器の使用予約をするには Scheduler を使用します。Scheduler にアクセスするには、ツールバー（表 9）にある Scheduler ボタンをクリックするか、メインウインドウで **Tools > Scheduler** を選択します。

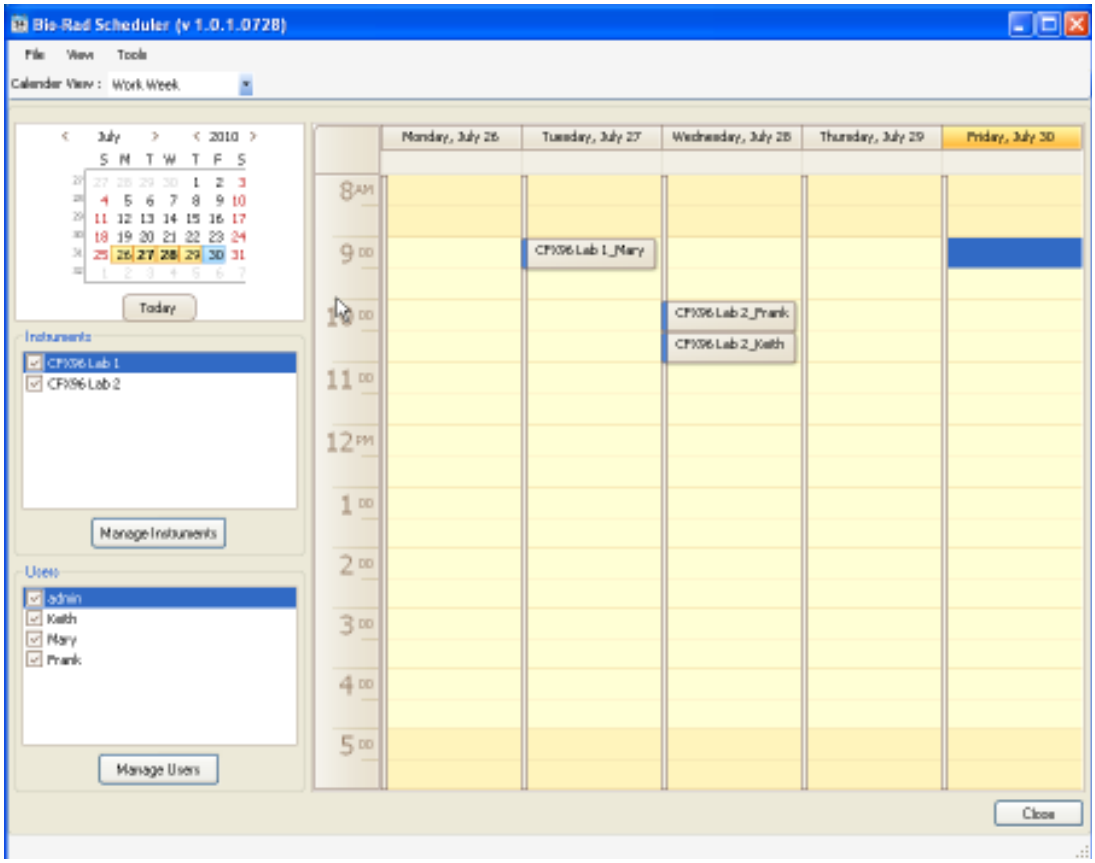


図 20 Shceduler メインウインドウ

Scheduler のセットアップ

1. 最初に Scheduler を起動したとき、User 情報、Instrument 情報、SMTP メール設定が CFX Manager ソフトウェアからインポートされます。
2. 新しい機器を追加するには、**View > Instrument Details** を選択、もしくは Scheduler メインウインドウ内の Instrument リスト(図 20)の下にある **Manage Instruments** ボタンをクリックします。Instrument Details ウインドウで、Name カラムに機器名を入力します。ドロップダウンメニューからモデルを選択、もしくは機器タイプがリストにない場合は空欄のままにします。ベースとオプティカルヘッドのシリアル番号の入力はオプションです。
3. 新しいユーザーを追加するには、**View > User Details** を選択、もしくは Users リストの下にある **Manager Users** をクリックします。User Details ウインドウ(図 21)で、Name カラムに新しいユーザーの名前を入力します。E メールアドレスを入れることでオプションとしての電子的な通知を送ることができます。
   注意: 電子的な通知を可能にするためには SMTP サーバーの設定が必要です。

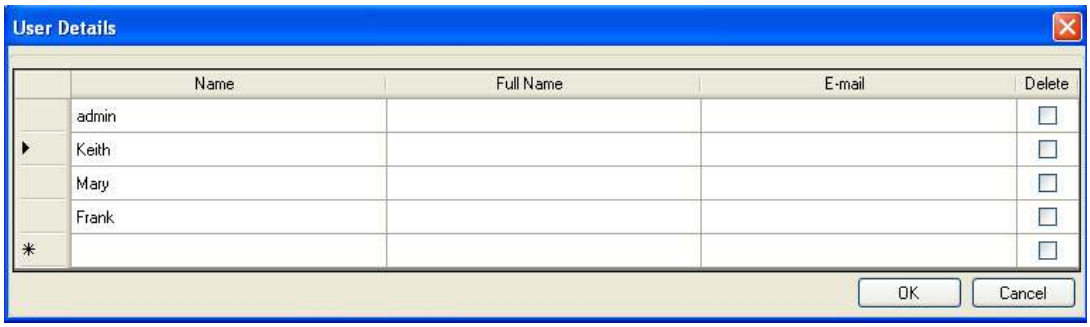


図 21 Scheduler の User Details ウインドウ

4. 機器やユーザーを削除するには、各 Details ウインドウを開き、該当する Delete カラムのボックスにチェックをつけます。
   警告！削除した機器やユーザーが関わる、全てのイベントはカレンダーから削除されます。

Scheduler メニューバー

Scheduler メニューバーの内容は表 10 に示します。

表 10 Scheduler のメニューバー項目

メニュー項目	コマンド	機能内容
File	Print Preview	印刷設定を調整するための印刷プレビューウインドウを開く。
	Print	画面に表示されているカレンダーを印刷する。
	Exit	Scheduler を閉じる。
View	Instrument Details	機器の名称、モデル、ベースもしくはオプティカルヘッドのシリアル番号の閲覧、編集、追加、削除を行うための Instrument Details ウインドウを開く。
	User Details	Scheduler ユーザーの閲覧、編集、追加、削除を行うための User Details ウインドウを開く。
	Log File	Scheduler の動作記録を閲覧する。
Tools	Import from CFX Manager	CFX Manager ソフトウェアから機器、ユーザー、SMTP メール情報をインポートする。
	Cleanup Events	オプションウインドウで特定した時期よりも古いイベントをカレンダーから削除する。
	Options	デフォルトのカレンダー設定、デスクトップアイコンの作成、PC 起動時の Scheduler 起動の有無、クリーンアップパラメーターの設定を行うウインドウを開く。

Scheduler のイベント入力

イベントの入力には:

1. カレンダーで特定のセル内でダブルクリックするか、右クリックで New Event を選択します。
2. ドロップダウンリスト(図 22)から機器やユーザーを選択します。
3. 開始・終了時間を入力します。カレンダー画面にイベントが一度現れたら、カレンダー内で別の位置にイベントエントリーをクリック&ドラッグすることで移動させることができます。
4. イベントに色の指定ができます(オプション)。
5. E メールや、イベントの開始に先立って設定した時間に表示されるポップアップリマインダーを含めるには、Reminder チェックボックスをチェックし、ドロップダウンリストから先行する時間を選択します。
   警告！リマインダーを有効にするには Scheduler を起動しておく必要があります。Scheduler の最小化しても、予定時刻に発生するポップアップや E メールのリマインダーは有効です。Close を選択することで Scheduler は終了します。

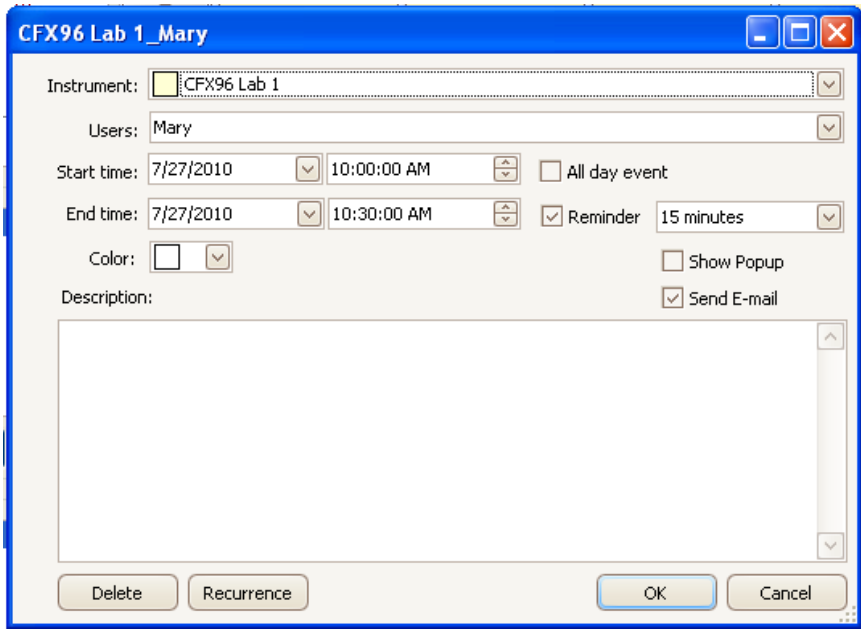


図 22 Scheduler の New Event ウインドウ

イベントのクリーンアップ

Scheduler のオプションウインドウ(下記)で特定した時期よりも古いイベントをカレンダーから削除するには **Tools > Cleanup Events** を選択します。
警告！特定した日よりも古いイベントは全て削除されます。

Scheduler オプション

Scheduler の表示、クリーンアップや起動の仕方を設定するには、**Tools > Options** を選択します。Scheduler のデフォルト設定をリストアするには、**Restore Defaults** をクリックします。

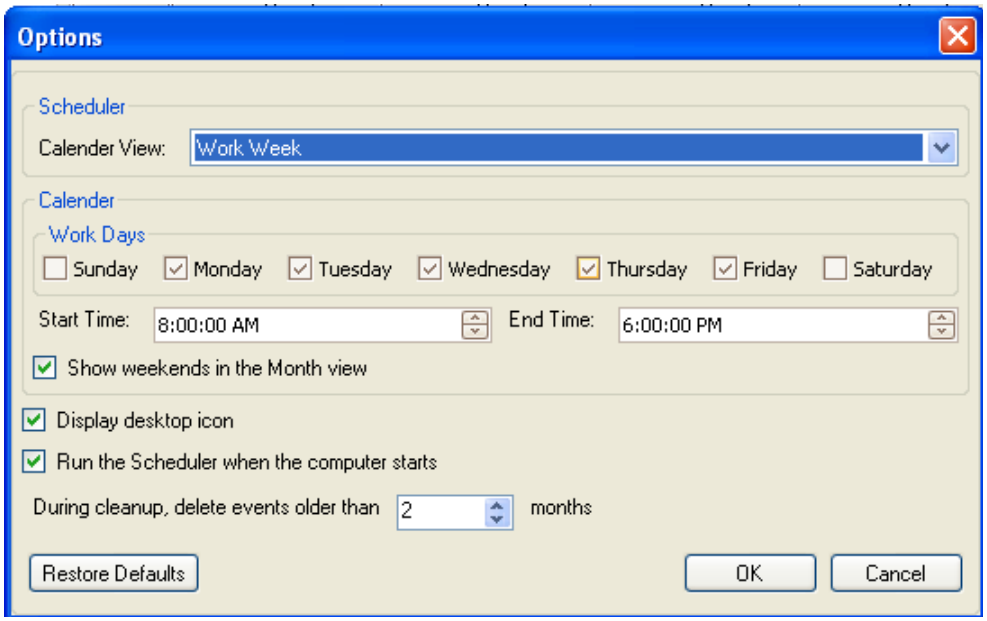


図 23 Scheduler オプションウインドウ

第 3 章ーランの実行

3　ラン実行

本章では、以下に示すCFX Managerソフトウェアによるラン実行に関する情報を解説します。

- Run Setup ウインドウ(31 ページ)
- PrimePCR ラン(32 ページ)
- Protocol タブ(33 ページ)
- Plate タブ(33 ページ)
- Start Run タブ(34 ページ)
- Run Details ウインドウ(35 ページ)
- Instrument Summary ウインドウ(38 ページ)

Run Setup ウインドウ

Run Setup ウインドウでは、セットアップやラン開始に必要となるファイルや設定項目に直接アクセスできます。以下のいずれかの方法にて、Run Setup ウインドウを開いてください。

- Startup Wizard の **Run Setup** タブ内の **User-defined** もしくは **PrimePCR** ボタンをクリックします(21 ページ)
- メインソフトウェアツールバーの **Run Setup** ボタンをクリックします(20 ページ)
- メインソフトウェアメニューバーから **File > New > User-defined Run** もしくは **PrimerPCR Run** の順で選択します(18 ページ)

Run Setup ウインドウには、以下の 3 つのタブが含まれています。

- **Protocol**:Protocol タブをクリックし、ランもしくは編集するために既存のプロトコールを選択するか、Protocol Editor ウインドウで新規プロトコールを作成します(41 ページ)
- **Plate**:Plate タブをクリックし、ランもしくは編集するために既存のプロトコールを選択するか、Plate Editor ウインドウで新規プレートを作成します(50 ページ)
- **Start Run**:Start Run タブをクリックして、ラン設定を確認し、1つ以上の装置を選択して、ランを開始します(34 ページ)

  注意: Protocol タブ画面に現時点で選択されているプロトコールに、リアルタイム PCR 解析用のプレートリード(データ表示→データ読み取り)されたステップが含まれない場合は、Plateタブは非表示となります。Plateタブを表示・確認するには、プロトコールの1ステップ以上に「**Plate Read**」を加えてください(43 ページ)。

  注意: メインソフトウェアメニューバーから **File > Repeat a Run** の順に選択するか、Startup Wizard 中の **Repeat Run** を選択して、過去に実行したランから新規に実験を開始できます。繰り返しを希望する実験のデータファイル(.pcrd)を選択してください。

Run Setup ウインドウを開くと、前面に Protocol タブが表示されます（図 24）。別のタブを開くには、そのタブをクリックします。あるいは、ウインドウの下部の **Prev** および **Next** ボタンをクリックしてください。

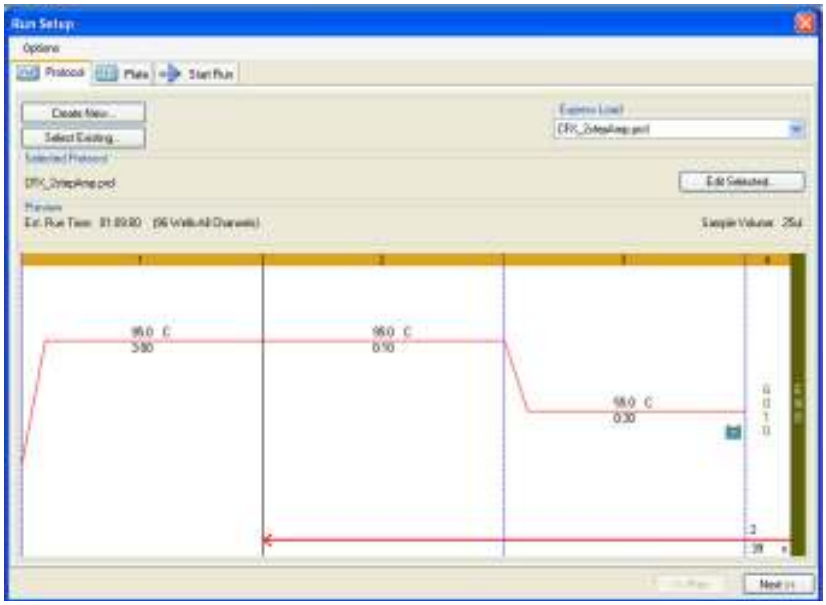


図 24 Protocol、Plate および Start Run タブが表示された Run Setup ウインドウ

PrimePCR ラン

PrimePCR ランはウェットラボにて検証済みかつ調整済みのパスウェイや疾患特異的なアッセイを行うことができ、以下のフォーマットで Bio-Rad より提供しています。
（注）国内では現在未対応の機能です

- **Pre-plated panels**: 生物学的パスウェイや疾患に関するアッセイを含んだプレート
- **Custom configured plates**: 興味あるターゲット、コントロール、リファレンスを選択するオプションを含むユーザー決定レイアウトでセットされたプレート
- **Individual assays**: リアルタイム PCR で使用する独立したプライマーセットを含んだチューブ

PrimePCR ランを実行するには以下のオプションからどれか一つを選択します。

- Startup Wizard の **Run setup** タブからの **PrimePCR** を選択
- Startup Wizard の **Repeat run** タブの **Recent Runs** リストから PrimePCR ランを選択
- メインウインドウから **File** > **New** > **PrimePCR run** を選択
- メインウインドウから **File** > **Open** > **PrimePCR Run File…**を選択

PrimePCR ランを一度選択したら、Run Setup ウインドウはデフォルトの PrimePCR プロトコールと選択された装置タイプを元にしたプレートレイアウトを含んで Start Run タブ上で開きます。トータルラン時間を減少させるために、融解曲線（Melt Curve）ステップを取り除くには、Protocol タブの Include Melt Step のボックスのチェックを外します。PrimePCR ランのプロトコールにはこれ以外の変更を加えるのはお勧めしません。デフォルトのプロトコールがアッセイのバリデーションに使われています。これからの逸脱は結果に影響するかもしれません。プロトコールの変更は結果として生じるデータファイルの **Run Information** タブや作成されるレポートに記録されます。

ランのプレートレイアウトに PrimePCR プレートのためのターゲット情報をインポートするには、**Real-time Status** タブ（37 ページ）もしくは **Data Analysis** ウインドウ（79 ページ）から **Plate Setup** > **Apply PrimePCR File** を選択して、適切なファイル（.csv）を選択します。ファイル名の

一部を使って PrimePCR フォルダ内を検索するか、プレートを注文した際に Bio-Rad ウェブサイトからダウンロードされたファイルがコンピュータ上に保存された場所をブラウズして、このファイルを選択します。

Protocol タブ

Protocol タブ画面には、Run Setup ウインドウ(図 24)に読み込まれた Protocol ファイルがプレビュー表示されます。Protocol ファイルには、温度ステップに関する説明のほか、加温・冷却速度やリッド温度を調節するオプションが含まれます。
次の各機能からいずれか 1 つ選択し、新規プロトコールを作成します。または、現在選択しているプロトコールの内容を変更します。

- **Create New ボタン:** Protocol Editor を開き、新規に Protocol ファイルを作成します。
- **Select Existing ボタン:** ブラウザウインドウを開き、Protocol タブに既存の Protocol ファイル(.prcl 拡張子)を選択して読み込みます。
- **Express Load プルダウンメニュー:** Protocol タブに取り込むプロトコールを速やかに選択することができます。
  アドバイス:この **Express Load** メニューへのプロトコール追加または削除する場合は、**Express Load** フォルダにファイル(.prcl 拡張子)を追加または削除します。このフォルダを表示するには、メインソフトウェアウインドウのメニューバーから **View > Show > User Data Folder** の順に選択します。
- **Edit Selected ボタン:** Protocol Editor ウインドウに現在選択しているプロトコールを開きます。

End Point Only Runs(エンドポイント限定ラン)

エンドポイントデータ取得ステップのみのプロトコールによるランを行う場合は、Run Setup ウインドウのメニューバーの選択肢から **Options > End Point Only Run** の順に選択します。初期設定のエンドポイントプロトコールは、30 秒間、60.0℃条件の 2 サイクルから構成され、Protocol タブに取り込まれます。
エンドポイント限定ランのステップ温度やサンプル容量を変更する場合は、**Start Run** タブをクリックして、**Step Temperature** または **Sample Volume** の数値を変更します。

Plate タブ

Plate タブ画面には、Run Setup ウインドウに取り込んだ選択された Plate ファイルがプレビュー表示されます(図 25)。リアルタイム PCR ランでは、この Plate ファイルに各ウェル内容、スキャンモード、プレートタイプ等の情報が含まれます。こうした情報内容は、CFX Manager ソフトウェアでのデータ収集・解析に利用されます。

次の機能をいずれか 1 つ選択し、既存プレートの選択、新規プレートの作成、または現時点で選択しているプレートの内容変更等を行います。

- **Create New ボタン:** Plate Editor を開き、新規に Plate ファイルを作成します。
- **Select Existing ボタン:** ブラウザウインドウを開き、Run Setup ウインドウ内に既存の Plate ファイル(.pltd 拡張子)を選択して取り込みます。
- **Express Load プルダウンメニュー:** プレートタブに取り込むプレートを速やかに選択することができます。
  アドバイス:この **Express Load** メニューへのプレート追加または削除する場合は、**Express Load** フォルダにファイル(.pltd 拡張子)を追加または削除します。このフォルダを表示するには、メインソフトウェアウインドウのメニューバーから **View > Show > User Data Folder** の順に選択します。

- **Edit Selected ボタン:** Plate Editor ウインドウに現在選択しているプレートを開きます。

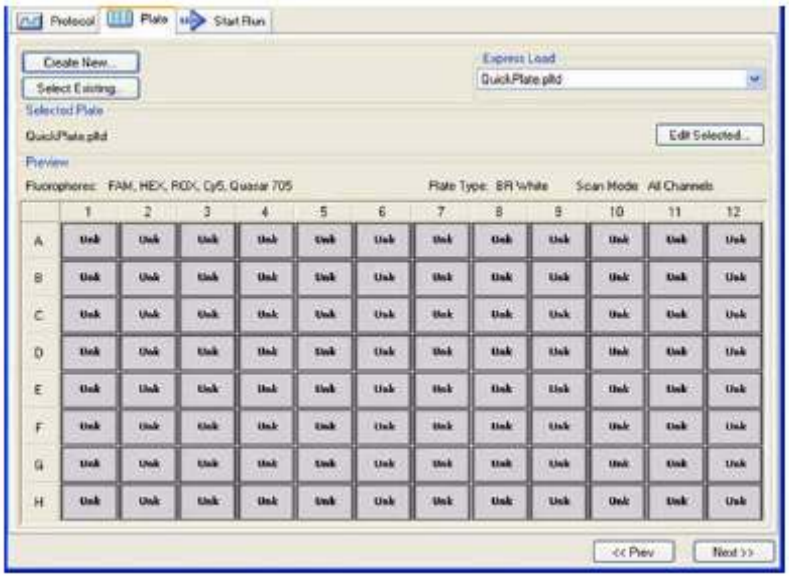


図 25 Plate タブウインドウ

Start Run タブ

Start Run タブ(図 26)には、以下のとおり、選択された Protocol や Plate ファイルなど、開始予定のランに関するデータを確認する項目のほか、ブロックの選択項目があります。

- **Run Information ペイン:** 選択した Protocol ファイル、Plate ファイル、データ取得スキャンモード設定等が表示されます。**Notes** ボックスにランに関する事項を入力することができます。
- **Start Run on Selected Block ペイン:** ブロックを 1 つ以上選択し、(必要に応じて)プロトコールのパラメータを変更します。その後、**Start Run** ボタンをクリックすると、実験が開始されます。

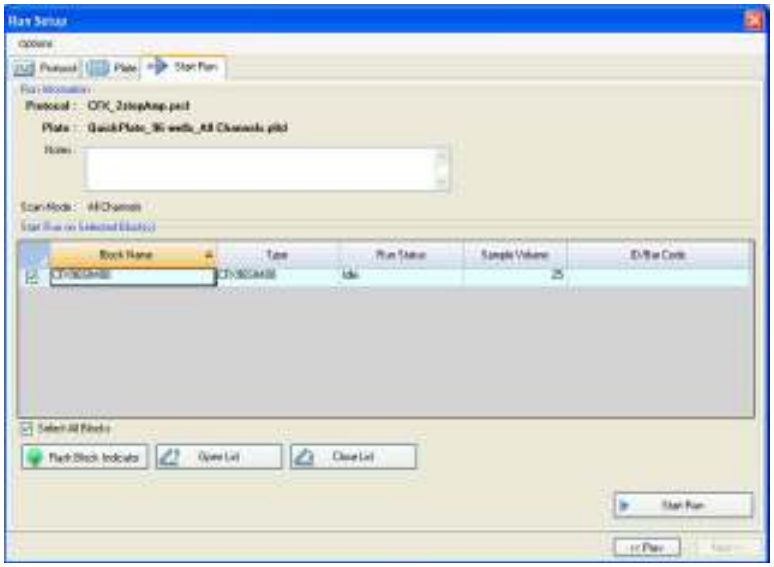


図 26 Start Run タブ

注意:スプレッドシート欄のサンプル容量を選択し、新たに数値を入力すると、Protocol

ファイルに表示されるサンプル容量から変更可能です。
注意:ラン ID(認識番号)は、ラン項目を選択し、バーコードリーダーでスキャンすることによって入力可能です。

Start Run on Selected Block(s)ペインのスプレッドシートにランパラメータを追加または削除するには、リスト上で右クリックしたうえで、メニューから項目を選択して表示します。パラメータを変更するには、スプレッドシート欄のテキスト表示部分をクリック選択して、新たにパラメータ入力するか、あるいはプルダウンメニューから新しいパラメータを選択してください。

- Lid Temperature:リッド温度を表示します。テキスト表示部を選択したうえで、別の温度を入力できます。

機器コントロール用ボタン

以下のスタートランタブに表示されるボタンをクリックすると、選択した機器を遠隔操作することができます。

- Start Run:現在選択されている機器のブロックで実験を開始します。
- Flash Block Indicator:現在選択されている機器のブロックに確認用の LED を点灯します。
- Open Lid:現在選択されている機器のブロックの電動リッドを開きます。
- Close Lid:現在選択されている機器のブロックの電動リッドを閉じます。

Run Details ウインドウ

Start Run ボタンをクリックすると、データファイルの名称を保存するようにソフトウェアから指示があります。ファイル保存後、Run Details ウインドウが表示されます。このウインドウには、ランの進捗状況をモニターするためのデータを確認することができます。

- Run Status タブ:現在のプロトコール状況の確認、リッドオープン、ランの中断、繰り返しステップの追加、ランの中止などを行います。
- Real-Time Status タブ:収集したリアルタイム PCR 蛍光データを表示します。
- Time Status タブ:プロトコール用の全画面カウントダウン時計を表示します。

図 27 は、Run Details ウインドウを示します。

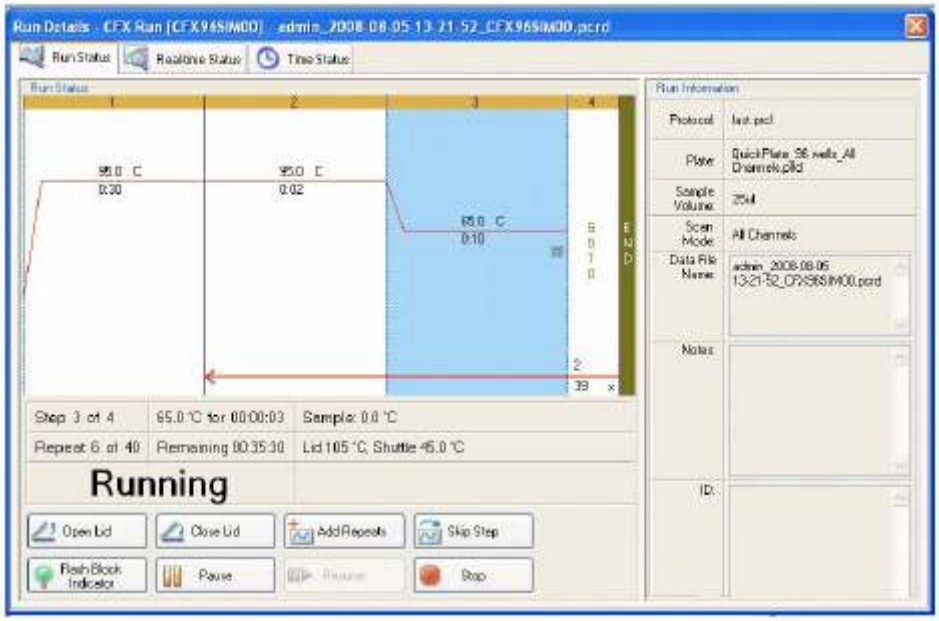


図 27 Run Details ウインドウの Run Status タブ

Run Status タブ

Run Status タブ（図 27）では、以下のとおり、Run Details ウインドウに現在のランの進捗状況が表示され、リッド管理や進行中のラン条件の変更を行うボタン（下記）が備わっています。

- **Run Status ペイン:** 現時点でのプロトコールの進捗状況、たとえば、現在のステップ、現在の GOTO リピート（繰り返し回数）、ブロック温度、現在のステップの残余保持時間、サンプル温度、リッド温度、および シャトル温度などが表示されます。
- **Run Status ボタン:** いずれかボタンをクリックすることにより、サーマルサイクラーを遠隔操作し、現在のプロトコールを中断することも可能です。
- **Run Information ペイン:** 実験に関する詳細情報を表示します。

Run Status タブ画面のボタン

以下の表 11 に示したボタンをいずれか押して、サーマルサイクラーブロックを操作します。あるいは進行中のラン条件を変更してください。

注意：GOTO 繰り返し回数を追加するなど、ラン実行時にプロトコールを変更しても、ランに関連する Protocol ファイルの内容は変更されません。こうしたプロトコール変更については、ランログに記録されます。

表 11 Run Status ボタン

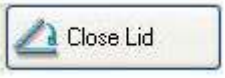
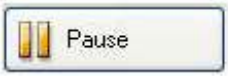
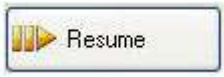
ボタン	機能内容
	選択したサーマルサイクラーの電動リッドを開く。 **警告！実験中にリッドを開くと、プロトコールが中断するため、結果データに影響が及ぶおそれがあります。**
	**選択したサーマルサイクラーの電動リッドを閉じる。**
	プロトコールに現時点での GOTO ステップ（サイクル）に繰り返し回数を追加する。このボタンは GOTO ステップのランが行われている時間帯のみ利用できる。

表 11 Run Status ボタン(続き)

ボタン	機能内容
	プロトコールでの現時点でのステップをスキップする。GOTO ステップをスキップする場合は、プロトコールでの GOTO ステップ全体をスキップして次のステップに進みますかと確認メッセージが表示されます。
	選択したブロック位置を確認するため、選択したサーマルサイクラーの LED を点灯する。
	プロトコールの実行を中断する。 注意:ラン実行の中断については、ランログに記録されます。
	中断していたランを再開する。
	ランを中止する。その際、データ変更が可能となる。

Real-Time Status タブ

Real-Time Status タブには(図 28)、プロトコールでの最初の 2 回のデータ読み取り後に、各サイクルで収集されたリアルタイム PCR データが表示されます。

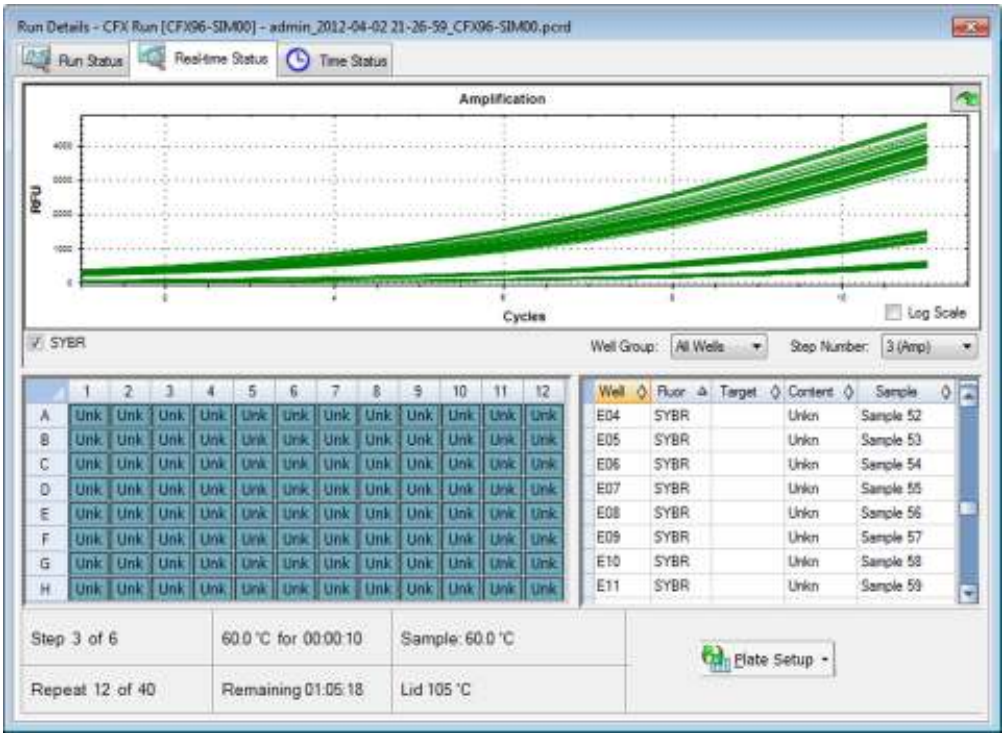


図 28 Real-time Status タブでのランデータ表示

Plate ファイルの編集

Real-Time Status タブ（図 28）の **Plate Setup** ドロップダウンメニューから **View/Edit Plate** を選択することで、進行中のランについてプレート設定を閲覧および編集できます。Plate Editor ウインドウで、チャプター5（Plate）で示されているように編集ができます。

アドバイス：Plate Editor ウインドウから Trace Styles の編集もでき、Real-Time Status タブで増幅曲線の色へ変更することができます。

Plate ファイルの変更

ラン中に Real-Time Status タブ（図 28）の **Plate Setup** ドロップダウンメニューから以下の一つを選択することでプレートのファイルの変更ができます。:

- **Replace Plate file**: ブラウザウインドウ内のリストから新しいプレートファイル（.pltd）を選択します
- **Apply PrimePCR file**: Smart 検索を使って得られるプレートレイアウトからのランファイルを検索するか、Bio-Rad ウェブサイトからダウンロードされて、PrimePCR フォルダ内に含まれていないファイルを探すのに Browse をクリックします。
  注意：CFX Manager ソフトウェアによって、Plate ファイルのスキャンモードおよびプレートサイズがチェックされます。このため、実験時に開始されたラン設定が必ず一致している必要があります。
  アドバイス：特に、Express Load フォルダ内の Quick Plate を用いてランを実行する場合などは、プレートファイルの変更が有効です。

Time Status タブ

Time Status タブには、現時点でのラン残余時間がカウントダウン表示されます（図 28）。

Instrument Summary ウインドウ

このウインドウには、ソフトウェアによって検知される機器とその状況を示すリスト表が表示されます。ウインドウを開くには、Detected Instruments ペインにある **View Summary** ボタン（22 ページの図 15）をクリックします。Instrument Summary ウインドウで右クリックして、オプションのリストへ変更できます。

図 29 は Instrument Summary ウインドウを示します。このブロック名称リストや接続機器の状況などが含まれます。各機器の状況を変更するには、1 個または複数のブロックを選択し、ツールバーにある各ボタンをクリックします。

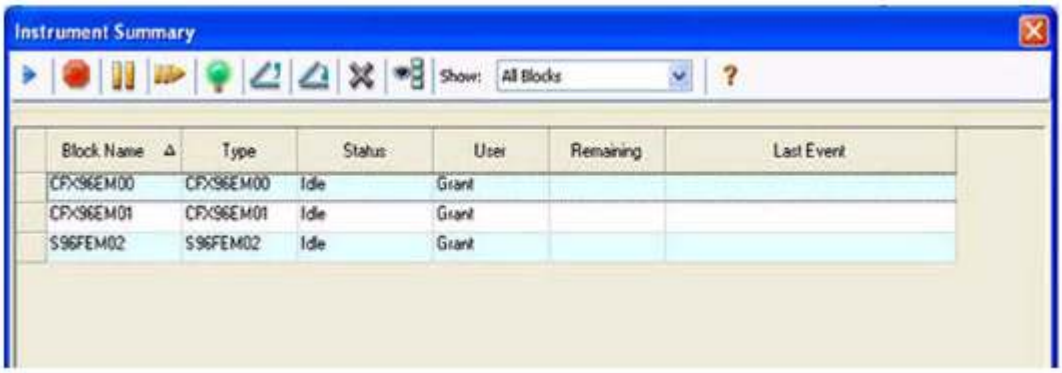


図 29 Instrument Summary ウインドウ

Instrument Summary ウインドウのツールバー

Instrument Summary ウインドウのツールバーには、表 12 に示す機能をもつボタンが装備されます。

表 12 Instrument Summary ウインドウのツールバーボタン

ボタン	ボタン名称	機能内容
	Set Up Experiment	Run Setup ウインドウを開き、選択したブロックによるランをセットアップする。
	Stop	選択したブロックで行っているランを中止する。
	Pause	選択したブロックで行っているランを中断する。
	Resume	選択したブロックで中断したランを再開する。
	Flash Block Indicator	現在選択されているブロックに確認用の LED を点灯する。
	Open Lid	選択したブロックの電動リッドを開く。
	Close Lid	選択したブロックの電動リッドを閉じる。
	Hide Selected Blocks	Instrument Summary リストに選択したブロックを表示しない。
	Show All Blocks	Instrument Summary リスト上で、選択したブロックをすべて表示する。
	Show	リスト表示されるブロックを選択する。表示項目の中から 1 つ選択し、全てブロック（All Blocks）、アイドル中のブロック（Idle Blocks）、ユーザーがラン実行中のブロック（My Running Blocks）、またはラン実行中のブロック（All Running Blocks）を表示する。

第 4 章－プロトコール

4 プロトコール

本章では、Protocol ファイルの新規作成や内容変更に関する機能について、以下の順で解説します。

- Protocol Editor ウインドウ(41 ページ)
- Protocol Editor の操作(43 ページ)
- 温度制御モード(46 ページ)
- Protocol AutoWriter(47 ページ)

Protocol Editor ウインドウ

プロトコールによって、温度ステップ、リッド温度、その他の機器オプションをコントロールします。ソフトウェアにて Protocol Editor ウインドウを開き、新規プロトコールを作成し、あるいは Protocol タブで選択しているプロトコールの内容を変更します。Protocol Editor でプロトコールの作成や変更が完了すれば、**OK** ボタンをクリックし、Run Setup ウインドウに Protocol ファイルを取り込んで、ランを実行します。

Protocol Editor ウインドウ

以下のいずれかの方法により、Protocol Edtior を開いてください。

- 新規プロトコールを作成するには、**File > New > Protocol** の順に選択します。あるいは、Protocol タブの **Create New** ボタンをクリックします(33 ページ)。
- 既存のプロトコールを開いて内容を変更するには、**File > Open > Protocol** の順に選択します。あるいは、Protocol タブの **Open Existing** ボタンをクリックします。
- Protocol タブで現行プロトコール内容を変更するには、**Edit Selected** ボタンをクリックしてください(33 ページ)。
  アドバイス:Protocol Editor ウインドウの初期設定を変更する場合は、User Preferences ウインドウの Protocol タブ上で変更内容を入力してください(148 ページ)。

Protocol Editor ウインドウ

Protocol Editor ウインドウ(図 30)では、以下の機能が利用できます。

- **メニューバー:**プロトコール用の設定項目を選択します。
- **ツールバー:**表示プロトコール用のボタンをクリックします。または選択項目を選びます。
- **プロトコール:**グラフ(上部)およびテキスト(下部)から構成される選択されたプロトコールを表示します。各ステップのグラフまたはテキスト表示される温度または滞留時間をクリックして、新たに数値を入力することができます。

- **Protocol Editor 関連ボタン:**テキスト表示の左側にあるボタンをいずれか 1 つクリックすると、プロトコール内容を変更できます。

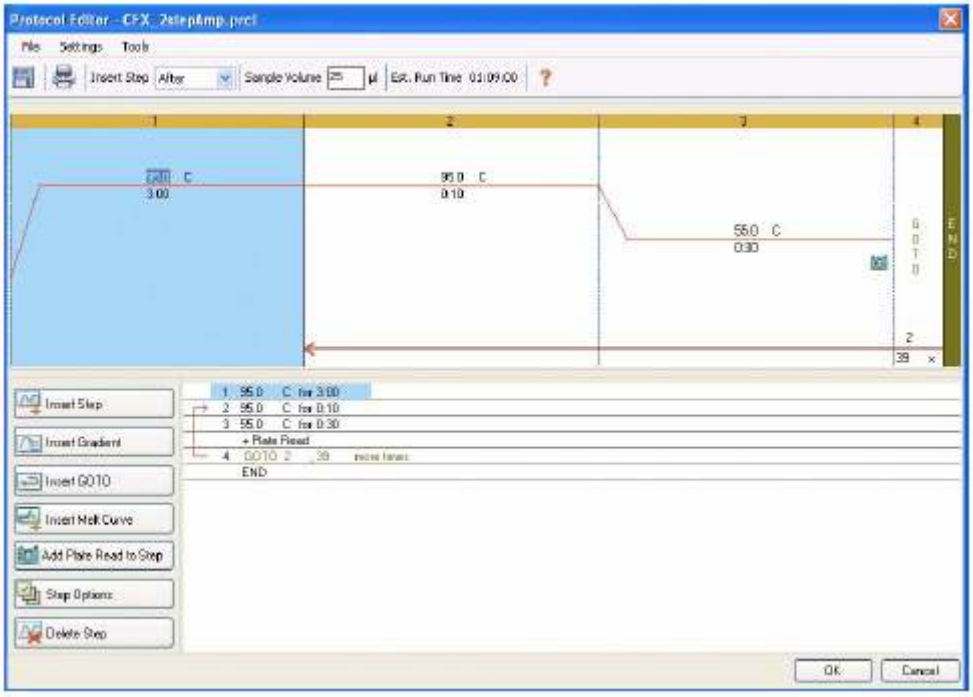


図 30 プロトコール編集用ボタンが表示される Protocol Editor ウインドウ

Protocol Editor のメニューバー

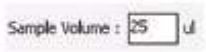
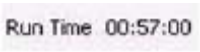
Protocol Editor ウインドウのメニューバーには、以下の表 13 に示す項目が含まれます。

表 13 プロトコールエディタメニューバー

メニュー項目	コマンド	機能内容
File	Save	現在のプロトコールを保存する。
	Save As	現在のプロトコールを別名で保存する、または別の場所に保存する。
	Close	Protocol Editor を閉じる
Settings	Lid Settings	Lid Settings ウインドウを開き、リッド温度を設定・変更します。
Tools	Gradient Calculator	グラジェントステップのブロックタイプを選択します。96 ウェルまたは 384 ウェルのいずれかを選択します。
	Run-time Calculator	機器およびスキャンモードを選択し、Run Setup ウインドウでランの推定時間を算定します。

以下に、Protocol Editor のツールバーボタンの機能を示します。

表 14. Protocol Editor のツールバーボタン

ツールバー項目	名称	機能内容
	Save	**現在の Protocol ファイルを保存します。**
	Print	**選択しているウインドウをプリントアウトします。**
	Insert Step	After **または** Before **を選び、強調表示されたステップの前後のいずれかにステップを挿入します。**
	Sample Volume	**サンプル容量は、0～50μL(96 ウェルブロックの場合)、または 0～30μL(384 ウェルブロックの場合)の範囲で入力します。サンプル容量によって、温度制御モードが決定されます(38 ページ参照)。ゼロ(0)入力により、ブロックモードが選択されます。**
	Run Time	**プロトコールステップおよび加温・冷却速度から推定されたラン時間が表示されます。**
	Help	**プロトコールに関するヘルプ情報が得られます。**

Protocol Editor の操作

Protocol Editor ウインドウには、プロトコール内容を変更するためのボタンが配置されています。まず、マウスポインタをステップに合わせた後、左クリック選択によって強調表示します。続いて、同ウインドウに左側にある Protocol Editor ボタンをいずれかクリックし、プロトコール内容を変更します。選択したステップの前後に新しいステップを追加する場合は、ツールバーの Insert Step ボックスで Before または After をいずれか選択します。

Insert Step ボタン

以下の手順により、Protocol Editor ウインドウにて、選択したステップの前後に温度ステップを追加してください。

1. **Insert Step** ボタンをクリックします。
2. 温度または保持時間を変更するために、グラフまたはテキスト表示される初期設定値をクリックし、新たに数値を入力します。
3. (オプション)**Step Options** ボタンをクリックすると、ステップに温度増減または時間増減オプションを入力できます(45 ページ)。

Plate Read の追加と削除

以下の手順により、ステップにプレートリード(データ取得)を追加するか、あるいはステップから削除してください。

1. グラフまたはテキスト表示のいずれかからステップをクリック選択します。

2. **Add Plate Read to Step** ボタンをクリックし、選択したステップにプレートリードを追加します。すでにプレートリードが含まれている場合は、ボタン上の文字が変化し、**Remove Plate Read** と表示されます。このボタンをクリックし、選択したステップからプレートリードを削除します。

Insert Gradient ボタン

以下の手順により、選択したステップの前後にグラジェントステップを追加してください。

1. **Insert Gradient** ボタンをクリックし、温度グラジェントステップを挿入します。
2. グラジェント用のプレートサイズが、96 ウェルまたは 384 ウェルのいずれかのブロックタイプに一致していることを確認します。プロトコールエディタメニューバーから **Tools** > **Gradient Calculator** の順に選択し、グラジェント用のプレートサイズを選びます。
3. グラフまたはテキスト表示部分からグラジェントのステップをクリックし、新たに温度を入力してグラジェント温度範囲を設定しなおします。あるいは、**Step Options** ボタンをクリックし、Step Options ウインドウにグラジェント範囲を入力します(45 ページ)。
4. グラフまたはテキスト上の初期設定時間をクリックし、新たに時間を入力して、保持時間を変更します。

図 31 では、グラジェントステップが挿入されています。ここでは、画面右下のグラジェント表の各列に温度が入力された状態にあります。

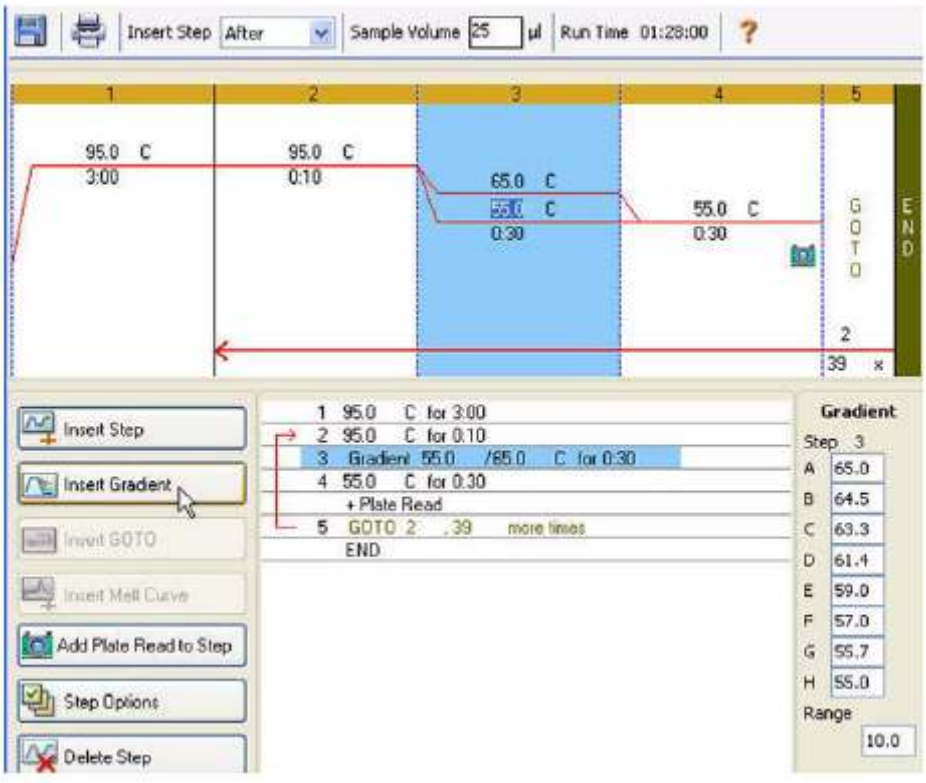


図 31 グラジェントステップを追加したプロトコール

Insert GOTO ボタン

以下の手順により、選択ステップの前後に GOTO ステップを追加してください。

1. **Insert GOTO** ボタンをクリックします。

2. グラフまたはテキスト表示部分の初期設定値をクリックし、GOTO ステップ回数または GOTO 繰り返し回数を新たに入力します。

図 31 では、プロトコールの最終部に GOTO ステップ 1 回が追加されています。この場合、ステップ 2～ステップ 4 が GOTO ループ（繰り返し）範囲となります。

Insert Melt Curve ボタン

以下の手順により、選択ステップの前後に融解曲線（Melt Curve）ステップを追加してください。

1. **Insert Melt Curve** ボタンをクリックします。
2. グラフまたはテキスト表示部分の初期設定値をクリックして、新たに融解温度範囲または増減時間を変更入力します。あるいは、別の方法として、**Step Options** ボタンをクリックし、Step Options ウインドウ上でグラジェント範囲を入力します（45 ページ）。
   注意：GOTO ループ（繰り返し）内には、融解曲線ステップを追加できません。
   注意：融解曲線ステップには、ステップ開始時の 30 秒保持時間が含まれています。この 30 秒間は、プロトコールに表示されません。

図 32 では、ステップ 6 の後に融解曲線ステップが追加されています。

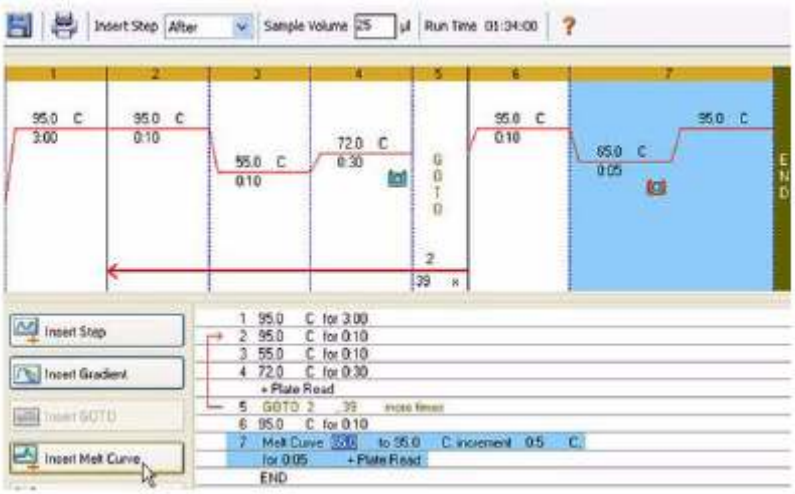


図 32 融解曲線ステップを加えたプロトコール

Step Options ボタン

以下の手順により、選択したステップのオプションを変更してください。

1. グラフまたはテキスト表示部分からクリックしてステップを選択します。
2. **Step Options** ボタンをクリックし、Step Options ウインドウを開きます。
3. 数字の入力・変更、またはチェックボックスのクリックによって、オプション項目を追加または削除してください。
   アドバイス：ステップを連続的に保持するには（無限大に保持）、時間はゼロ（0.00）を入力してください。

図32では、選択ステップでのグラジェント温度範囲が10℃に設定されている状態にあります。グラジェントステップに、温度増減(Increment)または加温・冷却速度変化(Ramp Rate)の項目を含めることはできません。

図 33 グラジェント用の Step Options

注意:グラジェントでは、ブロックの前列(Row H)が最低温度となり、ブロックの後列(Row A)で最高温度となる条件でランが行われます。

上の Step Options ウインドウには、ステップから以下の項目を追加するか、削除することができます。

- **Plate Read:**プレートリードを含めるには、ボックスにチェックを入れます。
- **Temperature**:選択ステップの目標温度を入力します。
- **Gradient:**ステップのグラジェント温度幅を入力します。
- **Increment**:選択ステップでの増減温度を入力します。この増減温度は、サイクルごとに変化する温度として設定温度に付加されます。
- **Ramp Rate**:選択ステップに加温冷却温度速度を入力します。速度範囲はブロックタイプによって異なります。
- **Time:**選択ステップの保持時間を入力します。
- **Extend:**選択ステップの延長時間を入力します。この延長時間は、サイクルごとに変化する時間として設定の保持時間に付加されます。
- **Beep**:ステップ終了時に電子音を発生させたい場合は、このボックスにチェックを入れます。

アドバイス:入力した値が設定可能範囲から外れている場合は、可能範囲内の最近似値に自動設定されます。

Delete Step ボタン

以下の手順により、プロトコールのステップを削除してください。

1. グラフまたはテキスト表示部分からステップを選択します。
2. **Delete Step** ボタンをクリックし、選択したステップを削除します。
   警告! 一度削除したステップを元の状態に戻すことはできません。

温度制御モード

プロトコールにおいてサンプルが目標温度に達したかどうかを確認するため、以下に示す 2 つの温度制御モードのうち一つが適用されます。

アドバイス:Start Run タブのサンプル容量パラメータを入力編集することにより、ランの実行前にサンプル容量を変更できます(34 ページ「Start Run タブ」参照)。

以下の温度制御モードを選択するため、Protocol Editor でサンプル容量を入力します。

- **Calculated モード**:1～50 μL(96 ウェルブロック)または 1～30 μL(384 ウェルブロック)の範囲でサンプル容量を入力した場合には、サンプル容量に基づいてサンプル温度が自動計算されます。このモードが標準モードとなります。
- **Block モード**:サンプル容量を 0(ゼロ) μL に入力した場合は、サンプル温度は測定ブロック温度と同等であると自動判定されます。

アドバイス:エンドポイント限定プロトコールを適用する場合は、Start Run タブの選択ブロックにサンプル容量を入力してください。

Protocol AutoWriter

Protocol AutoWriterを使用すると、PCRおよびリアルタイムPCRプロトコールを速やかに作成することができます。Protocol AutoWriter ウインドウを開くには、以下のいずれかの方法を選択してください。

- メインウインドウツールバーの **Protocol AutoWriter** ボタンをクリックする。
- メインウインドウのメニューバーから **Tools > Protocol AutoWriter** の順に選択する。

図 34 では、Protocol AutoWriter での作成されたプロトコール(ウインドウ下部)が示されています。

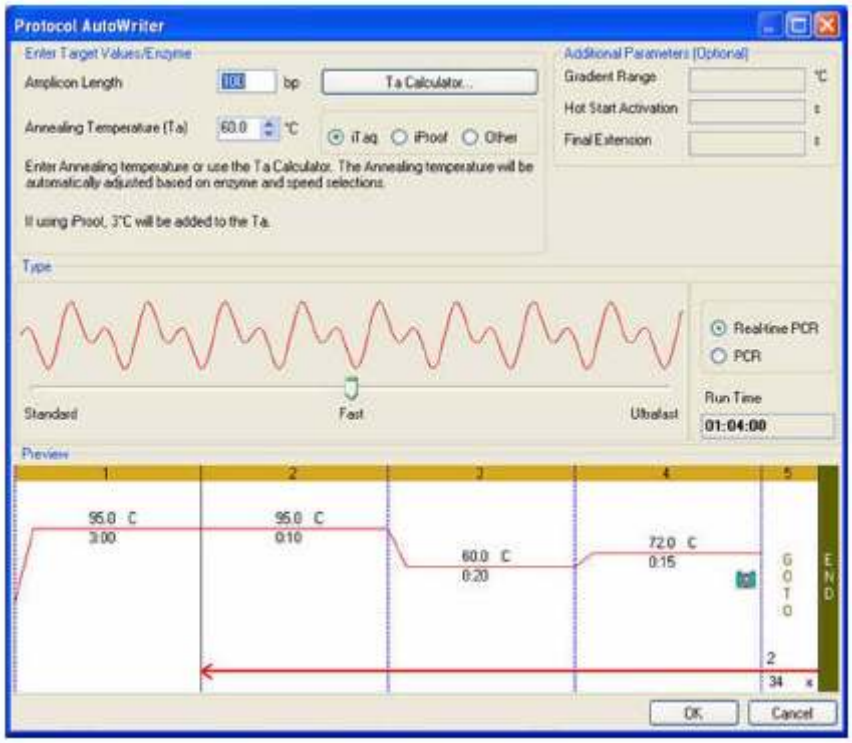


図 34 新規プロトコールが表示された Protocol AutoWriter ウインドウ

Protocol AutoWriter でのプロトコール作成

以下の手順により、Protocol AutoWriter を用いて新規プロトコールを作成してください。

1. ツールバーの **Protocol AutoWriter** ボタンをクリックし、Protocol AutoWriter ウインドウを開きます。

2. **Enter Target Values/Enzymes** ペインにある入力欄に **Annealing Temperature**(Ta)と **Amplicon Length** を入力します。プライマーのアニーリング温度が不明である場合は、**Ta Calculator** ボタンをクリックしてプライマー配列を入力し、アニーリング温度を自動算定してください。Ta Calculator 機能に適用される計算法等については Breslauer ら(1986 年)の文献を参照してください。

3. 選択項目（iTaq、iProof または Other）から使用する酵素タイプを選択します。
4. プロトコールのグラジェント範囲、Hot Start 活性化温度、または最終伸長時間を追加したい場合は、**Additional Parameters（Optional）**ペインにパラメータを追加します。
5. 速度タイプ表示部分のスライドバーを移動させることにより、プロトコールのラン速度（Standard, Fast または Ultrafast［標準、迅速、超迅速］）を選択します。このスライドバー移動により、全体のラン時間が調整されます。また、蛍光データを自動収集するため、**Real-time PCR** を選択します。
6. Preview ペインのプロトコールと全体ラン時間を確認します。必要に応じて変更します。
   アドバイス：ランを開始する前に、Start Run タブ上でパラメータ変更してリッド温度およびサンプル容量を入力してください（34 ページの「Start Run タブ」を参照）。
7. **OK** をクリックして、新規作成したプロトコールを確定します。プロトコールを保存しない場合は、**Cancel** をクリックしてウインドウを閉じます。
   アドバイス：Protocol AutoWriter で作成したプロトコール内容を変更する場合は、Protocol Editor ウインドウにある Protocol ファイル（.prcl 拡張子）を開きます（41 ページ参照）。
   注意：Protocol AutoWriter ウインドウで作成したプロトコールの実行によって必ず PCR 産物が得られることを弊社が保証するものではありません。

第 5 章－プレート設定

5　プレート設定

本章では、以下の Plate ファイルの作成・編集に関する情報を解説します。

- Plate Editor ウインドウ(50 ページ)
- プレートのサイズおよびタイプ(53 ページ)
- スキャンモード(53 ページ)
- Setup Wizard(54 ページ)
- Select Fluorophores ウインドウ(55 ページ)
- ウェルローディングコントロール(56 ページ)
- Well Groups Manager ウインドウ(61 ページ)
- Plate Spreadsheet View ウインドウ(63 ページ)

Plate Editor ウインドウ

Plate ファイルには、スキャンモードや蛍光色素、ウェル内容等が含まれており、データ解析方法に関する情報が表示されます。Plate Editor ウインドウを開き、実験用の各ウェルにサンプル情報を入力します。また、このウインドウにて、新規プレート作成や既存プレートデータの内容変更を行います。プレートの作成、プレート情報の変更が完了すれば、**OK** ボタンをクリックして Plate タブの Run Setup ウインドウにデータを取り込みます。

リアルタイム PCR 実験を行う場合は、Plate Editor に必要最小限の情報は入力します。1 つ以上のウェルに、サンプルタイプと蛍光色素名を設定する必要があります。

アドバイス:ランの前後およびラン中に、プレート設定を変更することが可能です。ただし、スキャンモード及びプレートサイズについてはラン後およびラン中に変更できません。

Plate Editor を開く

以下のいずれかの方法から、Plate Editor ウインドウ(図 35)を開いてください。

- 新しくプレートを作成する場合は、**File > New > Plate** の順に選択するか、Plate タブにある **Create New** ボタンをクリックします(33 ページ)。
- 既存プレートを開く場合は、**File > Open > Plate** の順に選択するか、Plate タブにある **Open Existing** ボタンをクリックします。
- Plate タブで現在のプレート内容を変更するには、**Edit Selected** ボタンをクリックします(33 ページ)。
- Data Analysis ウインドウ(79 ページ)で、データファイルに関連するプレート設定を開く場合は、ツールバーにある **View/Edit Plate** をクリックします。

図 35 Plate Editor ウインドウ

Plate Editor メニューバー

Plate Editor ウインドウのメニューバーには、表 15 に示す項目が含まれます。

表 15 Plate Editor のメニューバー項目

メニュー項目	コマンド	機能内容
File	Save	Plate ファイルを保存する。
	Save As	現在のプレートを別名で保存する。
	Close	Plate Editor を閉じる。
View	Show Well Notes	選択すると well loading control ペイン内に入力欄が表示される。1 つ以上のウェルについてノートを入力できる。
	Show Biological Set Name	選択すると well loading control ペイン内に入力欄が表示される。1 つ以上のウェルについて Biological Set 名を入力し選択できる。
	Plate Loading Guide	どのようにプレートを設定していくかのガイドが表示される。
Settings	Plate Size	サーマルサイクラーブロックのウェル数に対応するプレートサイズを選択する。CFX384 には 384-well を、CFX96 には 96-well をそれぞれ選ぶ。 注意:プレートサイズは、ランを実行するサーマルサイクラー内のブロックサイズに適合するものを選択してください。

表 15 Plate Editor のメニューバー項目（続き）

メニュー項目	コマンド	機能内容
	Plate Type	BR White および BR Clear など、サンプルを入れたプレートのウェルタイプを選択する。正確にデータ解析を行う場合は、必ず、プレートタイプをランに使用するタイプに合わせてください。 注意: 新たにプレートタイプを使用する場合には、キャリブレーションが必要となります（137 ページ）。
	Number Convention	科学的表記による数字の選択またはキャンセルを行う。
	Units	検量線から不明サンプルの定量を行う際にスプレッドシートに表記する単位を選択する。
Editing Tools	Setup Wizard	遺伝子発現解析用のプレートレイアウトと解析パラメータを定義する。
	Spreadsheet View/Importer	スプレッドシートを使ってターゲットとサンプルの情報を閲覧またはインポートする。
	Flip Plate	プレート情報を 180 度回転させる。

Plate Editor ツールバー

Plate Editor ウインドウにあるツールバーを用いれば、プレートデータローディング機能に直接アクセスできます。

表 16 に、Plate Editor ツールバーで利用できる機能項目をまとめます。

表 16 Plate Editor ツールバー項目

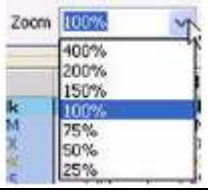
ツールバー項目	名称	機能内容
	Save	現在のプレートデータを保存する。
	Print	選択したウインドウ表示をプリントアウトする。
	Zoom	プレート表示を拡大・縮小する。
	Scan Mode	スキャンモードを選択すると、どのチャンネルでラン実行時の蛍光データを収集するかをシステムが識別する。All Channels（全チャンネル）、SYBR/FAM only（SYBR/FAM のみ）、または FRET を選択する。

表 16 Plate Editor ツールバー項目(続き)

ツールバー項目	名称	機能内容
	Well Groups	Well Groups Manager ウインドウを開き、現在のプレートのウェルグループをセットアップする。
	Trace Styles	増幅曲線の色とシンボルを選択する。
	Help	ヘルプを開き、プレートに関する情報を得る。
	Plate Loading Guide	プレートのセットアップ法、ウェルデータを取り込む方法を示したクイックガイドを表示する。

プレートサイズおよびタイプ

このソフトウェアによって、実験時にすべてのウェルに対して以下のプレート設定が適用されます。

- **Plate Size:**リアクションモジュールブロックのサイズを意味するプレートサイズを選択します。Startup Wizard のプルダウンメニューにて CFX96 または CFX384 のいずれかのモジュールサイズを選択すると、Run Setup ウインドウの Plate タブに表示される設定サイズが変更されます。Plate Editor にて、設定メニューからプレートサイズを変更することもできます(表 15)。なお、ラン実行中またはラン後にはプレートサイズを変更できません。
- **Plate Type:**Settings メニューから透明ウェル(BR Clear)または白色ウェル(BR White)を選択します。ランに使用する予定の蛍光色素が選択したプレートタイプ用にキャリブレーションされていることをあらかじめ確認しておきます。
  注意:CFX96 および CFX384 は、工場出荷時に多くの蛍光色素であらかじめキャリブレーションされています(CFX384 は白色ウェルのみ)。こうしたキャリブレーション処理については、使用するシステム、蛍光色素およびプレートタイプを特定して行われます。システム上で蛍光色素とプレートの新規組み合わせをキャリブレーションする場合は、**Tools > Calibration Wizard** の順に選択してください(166 ページの「Calibration Wizard」の項を参照)。

Scan Mode

CFX96 および CFX384 オプティカルリアクションモジュールは、それぞれ 6 チャンネル(CFX96)または 5 チャンネル(CFX384)で蛍光色素を励起し、検出することができます。両システムとも、複数のデータ取得スキャンモードを使用してランの実行時に蛍光データが収集されます。

Plate Editor ウインドウのツールバーにある以下の Scan Mode を 1 つ選択してください。

- **All Channels:**CFX96 では 1〜5 チャンネル、CFX384 では 1〜4 チャンネルが含まれます。
- **SYBR/FAM only:**チャンネル 1 のみ。短時間でのスキャンが可能です。
- **FRET:**FRET チャンネルのみ。短時間でのスキャンが可能です。

Trace Styles

プレート設定時とラン実行中において、増幅曲線の色を変更することができます。Real-time Status ウインドウで表示される曲線に色が反映されます。Trace Styles のさらなる情報は 95 ページを参照してください。

Setup Wizard

Setup Wizard はランの前、ラン中、ラン終了後のいずれでも、正規化遺伝子発現解析のために必要なプレートレイアウト情報を入力するのに使用できます。ターゲット名、サンプル名、プレートでの位置、リファレンス遺伝子とコントロールサンプルをこのウインドウで全て入力します。

Setup Wizard（図 36）は Plate Editor ウインドウメニューバーから **Editing Tools > Setup Wizard** を選択して開きます。

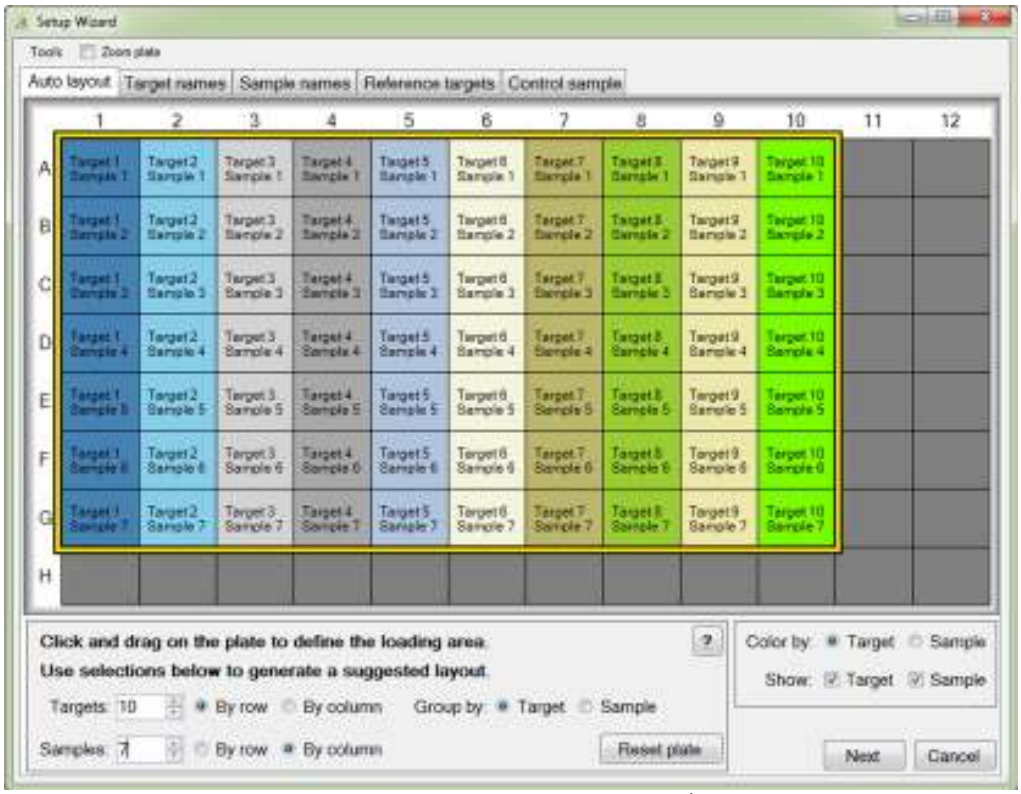


図 36 Setup Wizard の Auto Layout タブ

以下のいくつかのステップによってプレートレイアウトを作成します。

1. **Auto layout** タブ: 設定したいエリアを一つのウェルからドラッグして囲んで決めます。載せたいターゲットとサンプルの数を入力します。もし選択したエリアに数が合わない場合、数を減らすか、プレートエリアを増やす必要があります。プレート上のアイテムの方向やグルーピングは特定できます。
   注意: プレートレイアウトが決められたパターンがなければ、**Target names** タブからはじめてプレート上のターゲットを手動的に置いていきます。複数のウェルを選択するにはクリック&ドラッグを使います。
2. **Target names** タブ: ターゲットグループをクリックして、下のボックス内に名称を入力します。複数のターゲットグループはクリック&ドラッグで選択することができます。
   アドバイス: 名称入力後、Tab キーを押すと右にある次のグループに、Enter キーを押すと下にある次のグループに移動します。

3. **Sample names** タブ: サンプルのグルーピングをクリックして、下のボックスに名称を入力します。複数のサンプルグループはクリック&ドラッグで選択することができます。
   アドバイス: ターゲットもしくは名称を入力する時、Control キーをホールドしたままクリックすることで隣接しないウェルのグループを選択することができます。
4. **Reference targets** タブ: 正規化遺伝子発現解析のためのリファレンスとして使用するターゲットを1つ以上クリックします。
5. **Control sample** タブ: 相対的遺伝子発現解析のためのコントロールとして使用するサンプルを 1 つクリックします。
6. プレートに情報を入力が終わったら **OK** ボタンをクリックします。Plate Editor を使ってさらに編集を加えることもできます。
   注意: **Auto layout** タブへ戻ると、プレートレイアウトはリセットされます。レイアウトは **Tools > Clear Plate** を選択することでもリセットが可能です。
   アドバイス: プレートレイアウトのウェル内のテキストをより簡単に読むために、**Zoom plate** ボックスをクリックすると拡大表示されます。

Select Fluorophores ウインドウ

Select Fluorophores ウインドウには蛍光色素のリストが表示されます。蛍光色素を選択することで、Plate Editor でのウェルローディングコントロールにその蛍光色素が表示されます。このウインドウを開くには、Plate Editor 右側の **Select Fluorophores** ボタンをクリックします。

注意:同ウインドウにリスト表示される蛍光色素数は、Plate Editor で選択されているスキャンモードによって異なります。SYBR/FAM only モードを選択した場合は、Select Fluorophores ウインドウにはチャンネル 1 の蛍光色素のみ表示されます。

注意:このリストには、(キャリブレーションなしに)蛍光色素を追加・削除することはできません。新たに蛍光色素を追加するには、Calibration Wizard によってキャリブレーションする必要があります(166ページ)。このキャリブレーション後に、Select Fluorophores ウインドウに新しい蛍光色素が追加されます。

蛍光色素名の横に表示されるチェックボックスの **Selected** をクリックすることで、Plate Editor ウインドウの右側のリストに蛍光色素が追加、もしくは削除されます。

この例では、利用可能な蛍光色素のリストから SYBR が選択されています(図 37)。

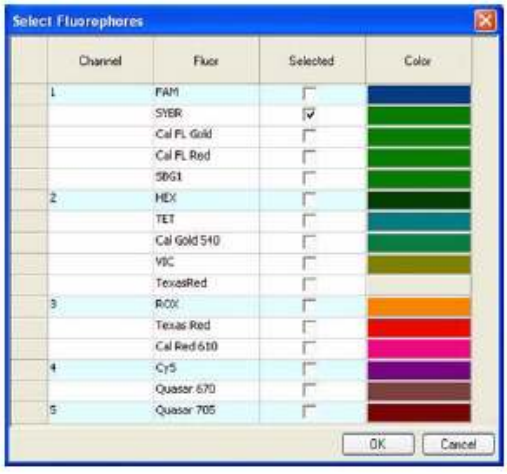


図 37 Select Fluorophores ウインドウ

- 蛍光色素表示の横の **Color** ボックスをクリックして、Plate Editor ウインドウおよび Data Analysis のグラフに表示される各蛍光色素の色を新たに選択します。
  注意:ランを実行する前に、プレートに指定した蛍光色素がシステム上でキャリブレーションされているかどうか自動確認されます。その後、キャリブレーションされていない蛍光色素が含まれている場合には、プレートによるランを実行することはできません。

ウェルローディングコントロール

Plate ファイルには、ラン用サンプルがロードされた各ウェルの内容に関する情報が含まれます。

ラン終了後、ソフトウェアによって、ウェル内容の入力情報はウェルに収集された蛍光データとリンクされるほか、Data Analysis ウインドウで該当の解析に適用されます。たとえば、スタンダードサンプルタイプを設定したウェルは検量線の作成に使用されます

遺伝子発現のランを設定する場合は、以下のウェル内容に関するガイドラインを考慮してください。

- **Target Name**:ロードされたウェルごとに、1 種類以上のターゲット DNA 配列名 (遺伝子名)。1 種類の蛍光色素に対してターゲット DNA 配列を割り振ります。
- **Sample Name**:ロードされたウェルごとにサンプルに対応する 1 種類以上の識別名称または状態を示す名称。たとえば、「0 hr」、「1 hr」、「2 hr」など。
  アドバイス:Data Analysis ウインドウ内の Gene Expression タブ画面でデータ比較するため、ターゲット DNA 配列名とサンプル名をウェル間で一致させてください。各名称とも、同一の句読点および語間スペースにしてください。たとえば、「Actin」というターゲット DNA 名称は「actin」と同一ではなく、「2hr」というサンプル名も「2 hr」と同一であると認識されません。名称の一貫性を得るために、User Preference ウインドウの Plate タブ画面でターゲット DNA 配列名称とサンプル名称のライブラリに統一した名称を入力しておくことをお勧めします(135 ページ)。
- **Biological Set Name**:**Tools > Show Biological Set Name** を選択することでウェルローディングコントロールに Biological Set Name ペインが表示され、1つ以上のウェルに生物学的セット名を入力します。

プレート表示にマウスポインタを合わせて左クリックし、内容情報をロードするウェルを選択します。複数のウェルを選択する場合は、マウスボタンを押したままドラッグします。プレート表示の右側にあるボタンおよびリストは、ウェル情報のロードに必要なオプションとなります(表 17)。

表 17 Plate Editor でのプレートおよびウェル情報ロードのオプション

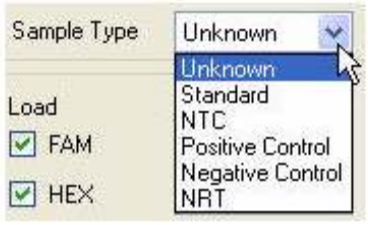
オプション	機能内容
	**ウェルの選択後、最初にサンプルタイプの情報をロードしてください。プルダウンメニューから Sample Type を選択し、選択ウェルにサンプルタイプ情報を割り当てます。サンプルタイプには、Unknown (不明)、Standard (標準)、NTC (対照テンプレートなし)、Positive Control (陽性対照)、Negative Control (陰性対照)、NRT (逆転写なし) があります。**

表 17　Plate Editor でのプレートおよびウェル情報ロードのオプション（続き）

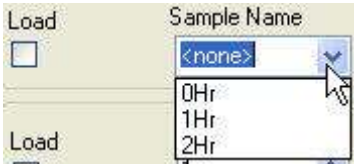
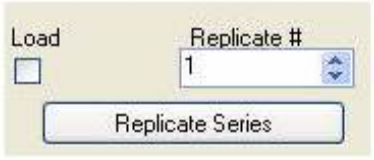
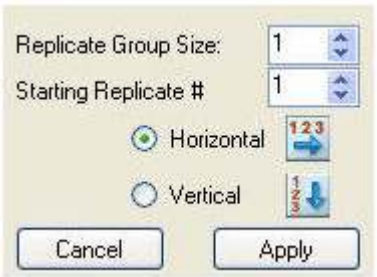
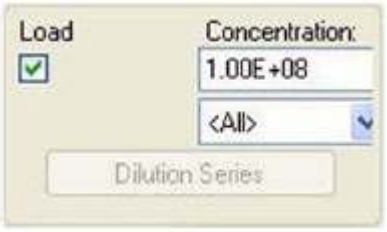
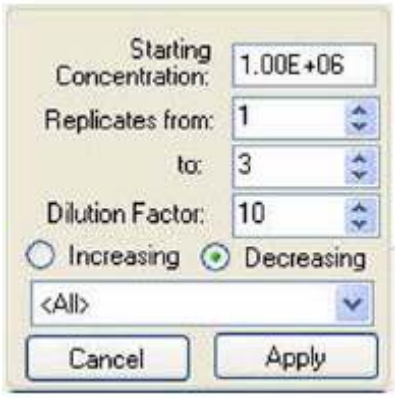
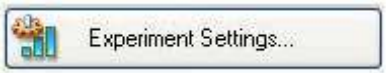
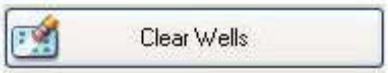
オプション	機能内容
	Load ボックスをチェックすると、選択したウェルに蛍光色素を追加できます。その場合、各蛍光色素がそれぞれ 1 つの **Target Name** に対応します。**Load** リストから蛍光色素を追加するには、Select Fluorophores ウインドウで選択します。 遺伝子発現解析を行う場合、あるいは複数のターゲット DNA を識別するには、Target Name プルダウンメニューから名称を 1 つ選択し、Enter キーを押してウェル内に取り込みます。ターゲット DNA 名称を削除する場合は、Delete キーを押して Enter で確定します。 アドバイス：現時点で使用するプレートに限ってプルダウンメニューに新しいターゲット DNA 名称を追加する場合は、このプルダウンボックスに新規名称を入力し、Enter キーで確定してください。
	遺伝子発現解析を行う場合、または複数サンプルを識別するには、プルダウンメニューから Sample Name（サンプル名）を 1 つ選択し、選択したウェルのサンプル名をロードします。サンプル名を削除するには、キーボードの Delete キーをクリックし、Enter で確定します。 アドバイス：現時点で使用するプレートでプルダウンメニューにサンプル名を新たに追加する場合は、このプルダウンボックスに新規の名称を入力し、Enter キーで確定してください。
	リプリケート番号をロードするためには、選択したウェルに同一のウェル内容情報が含まれている必要があります。同一の情報にない場合は、複製番号を取り込むことができません。 Load ボックスをクリックすると、選択したウェルに **Replicate #**（リプリケート番号）を追加できます。選択したウェルからリプリケート番号を削除する場合は、Clear Replicate #をクリックします。 アドバイス：一連のウェル群に複数のリプリケート番号を割り当てるには、Replicate Series ボタンをクリックしてください。
	Replicate Series ペインでは、一連のウェル群に複数のリプリケート番号を適用することが可能です。リプリケートの 1 グループのウェル数を選択して Replicate Group Size を入力してください。開始リプリケート番号を追加する場合は、Starting Replicate **#**を選択します。 注意：このリプリケートのグループへの連番の割り振りは、左から右の方向（Horizontal）または上から下の方向（Vertical）を選択します。

表 17　Plate Editor でのプレートおよびウェル情報ロードのオプション（続き）

オプション	機能内容
	Concentration ボックスに番号を入力または変更することにより、Standard のサンプルタイプのウェルに濃度を入力します。1 種類の蛍光色素についての濃度を適用するには、Concentration ボックス下のプルダウンメニュー（<All>）から蛍光色素を 1 つ選択します。濃度データを削除する場合は、キーボードの Back Space キーを押し、Enter で確定します。 Dilution Series（希釈系列）ボタンを有効にするには、1 種類の Standard のサンプルタイプが入るウェルを複数選択してください。
	Dilution Series ボタンをクリックすると、Standard の濃度の希釈系列を入力でき、検量線を適用できます。 希釈系列の Starting Concentration（開始濃度）、Replicates from（開始リプリケート番号から終了リプリケート番号まで）および Dilution Factor（各リプリケートのグループごとの濃度変化）をそれぞれ入力します。希釈系列の濃度を増やす場合は Increasing を選択し、少なくする場合は Decreasing を選択します。最後に、プルダウンメニューから希釈系列に適用する蛍光色素名を選択して、Apply をクリックします。
	View > Show Well Note の順に選択し、このペインを表示します。次にウェルを選択してプルダウンメニューにメモ内容を入力することにより、1 つ以上のウェルに情報を割り当てることが可能です。入力した情報は、Quantification タブのスプレッドシートに表示されます。
	View > Show Biological Set Name の順に選択し、このペインを表示します。次にウェルを選択してプルダウンメニューに生物学的セットを入力することにより、1 つ以上のウェルに生物学的セットに関する情報を割り当てることが可能です。入力した Biological Set Name はサンプル解析に反映され、Biological Set Analysis Options で 4 つの構成のうち 1 つを指定します。
	Experiment Settings ボタンをクリックすると Experiment Settings ウインドウが開き、ターゲット DNA 配列配列およびサンプル名称の一覧・管理できるほか、遺伝子発現に関するランの設定が可能となります。
	Clear Replicate #ボタンをクリックすると、選択したウェルのリプリケート番号が消去されます。
	Clear Wells ボタンをクリックすると、選択したウェルのロード情報がすべて完全に消去されます。

注意：ウェルの情報は他のウェルにコピー＆ペーストが可能です。実施するには、コピーした

いウェル(一度に選択できるのは1ウェルのみ)をハイライトさせ、右クリックし、**Copy Well** を選択します。ペーストしたいウェルを1つ以上ハイライトさせて、**Paste Well**を選択します。control キー押しながらウェルをクリックすることで隣り合わないウェルでも複数のウェルを選択し、ペーストできます。

Experiment Settings ウインドウ

以下のいずれかの方法により、Experiment Settings ウインドウを開いてください。

- Plate Editor を使用している場合は、**Experiment Settings** ボタンをクリックします。
- Data Analysis ウインドウでデータ解析時の場合は、**Gene Expression** タブ画面から **Experiment Settings** ボタンをクリックします。

Experiment Settings ウインドウを開くと、ターゲット DNA 配列配列およびサンプルリストを表示・変更できるほか(図 38)、**Biological Set Names** がウェルに追加されている場合には遺伝子発現解析のサンプルグループを設定できます。

- **Targets(ターゲット DNA 配列)**:各 PCR ランのターゲット DNA 配列、たとえば遺伝子名や配列名が一覧表示されます。ランでのリファレンス遺伝子を割り付ける場合には、Reference ボックスをクリックします。
- **Samples(サンプル)**:ターゲット DNA 配列のソースを示すサンプル名、たとえば、1 時間目に採取したサンプル(たとえば 1 hr)または特異的な個体から採取したサンプル(たとえば"mouse1")などが一覧表示されます。ランで、対照を割り付ける場合には、**Control** ボックスをクリックします。

図 38 では、Targets タブ画面が選択され、解析設定が表示されています。

図 38 Experiment Settings ウインドウでの Targets タブ画面

図 39 では、Samples タブ画面が選択され、解析設定が表示されています。

図 39 Experiment Settings ウインドウでの Samples タブ画面

上記のタブ画面で設定値を変更する場合は、以下の方法に従ってください。

- 新しいターゲットDNA配列およびサンプル名称を追加するには、**New**ボックスに名称を入力し、さらに **Add** をクリックします。
- リストからターゲット DNA 配列およびサンプル名称を削除するには、その列にある **Select to Remove** ボックスをクリックし、さらに **Remove checked items(s)**ボタンをクリックします。
- 遺伝子発現データ解析用のリファレンスとしてターゲット DNA 配列を選択するには、そのターゲット DNA 配列名称の横にある **Reference** ボックスをクリックしてください。
- 遺伝子発現データ解析用に対照サンプルとしてサンプルを選択するには、そのサンプル名の横にある **Control** ボックスをクリックします。

Experiment Settings ウインドウにある **Show Analysis Settings** ボックスをクリックすると、Gene Expression タブ画面で使用する解析パラメータを表示または変更することができます。

ターゲット DNA 配列のパラメータを設定する場合:

- **Color** 欄の色表示部分をクリックし、Gene Expression グラフの表示されるターゲットDNA配列の色を変更します。
- 各ターゲットDNA配列の増幅効率に関する数値を入力します。データに検量線が含まれている場合は **Auto Efficiency** を選択すると、ソフトウェアにより自動的に増幅効率が算定されます。このほかの方法として、以前に算定された増幅効率を入力します。

Samples タブにてサンプルを設定する場合:

- **Color** 欄の色表示部分をクリックし、Gene Expression グラフの表示されるサンプルの色を変更します。
- **Show Graph** の欄にあるボックスをクリックして、**Color** 欄で選択した色で Gene Expression グラフにサンプルを表示します。

Well Selector 右クリックメニュー項目

ウェル上で右クリックした場合のリストは下記の表通り。

表 18 Plate Editor Well Selector ウインドウでの右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy Well	**別の 1 つ以上のウェルへペーストするためのウェル内容をコピーします。**
Paste Well	**コピーしたウェルから別の 1 つ以上のウェルへ内容をペーストします。**
Copy to Clipboard	**文書としてペーストするためにウェルからテキスト情報をクリップボードにコピーします。**
Copy as Image	**画像として Well Selector 画面をコピーします。**
Print…	**Well Selector 画面を印刷します。**
Print Selection…	**現在選択されている部分を印刷します。**
Export to Excel…	**エクセルスプレッドシートとしてデータを出力します。**
Export to Text…	**テキスト文書としてデータを出力します。**
Export to Xml…	**.xml 文書としてデータを出力します。**
Export to Html…	**.html 文書としてデータを出力します。**
Find	**特定のテキストで検索します。**
Export Well Info to Excel	**.csv 文書としてウェルのテキスト情報を出力します。**

Well Groups Manager ウインドウ

ウェルグループを作成することは、1 つのプレートを複数のウェルのサブセットに分割して Data Analysis ウインドウ上で独立して解析することが可能です。ウェルグループが設定されれば、独立したグループでデータ解析するために、Data Analysis ウインドウでウェルのサブセットを 1 つ選択してください。たとえば、1 つのプレート上で複数の実験を解析するか、別の検量線を用いて各ウェルグループを解析する場合は、ウェルグループを設定します。

注意：初期設定では、ウェルグループが **All Wells**（全ウェル）となっています。

ウェルグループの作成

以下の手順により、Well Groups Manager ウインドウでウェルグループを作成してください。

1. Plate Editor のツールバーにある **Well Groups** ボタンか、Data Analysis ウインドウのツールバーにある **Manage Well Groups** ボタンをクリックします。
2. **Add** をクリックして、新規グループを作成します。その後、プルダウンメニューに最初のグループとして **Group 1** の名称が表示されます。
3. ウェルグループ上にてクリック&ドラッグし、プレート表示内でウェルグループを構成するウェルを選択します。選択したウェルが青色に変わります（図 40）。
4. （オプション）グループ名を変更する場合は、プルダウンメニューで該当するグループ名称を選択し、新たに名称を再入力します。
5. （オプション）ウェルグループをさらに作成するには、上の手順 1 および 2 を繰り返します。

6. （オプション）ウェルグループを削除するには、プルダウンメニューから該当するグループ名を選択し、**Delete** ボタンを押します。

7. ウインドウを終了するには **OK** をクリックします。または変更を残さずウインドウを閉じるには、**Cancel** を押してウインドウを閉じます。

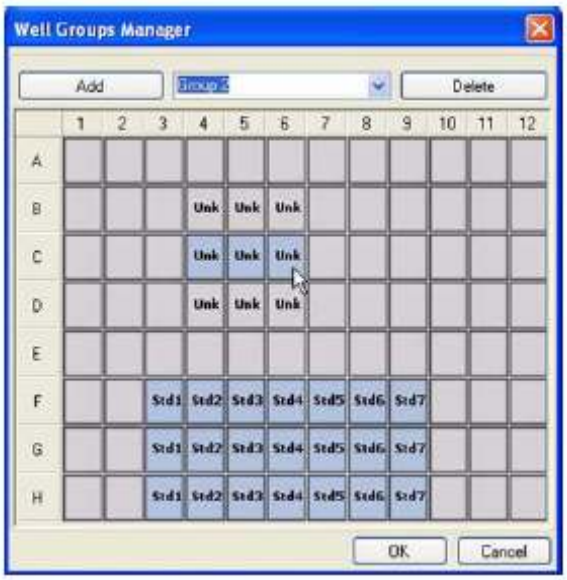


図 40 Well Group Manager ウインドウのウェル色

Plate Spreadsheet View ウインドウ

Plate Speadsheet ウインドウには、Plate Editor のプレートの内容が表示されます。Plate Editor メニューバーから **Tools > Show Spreadsheet Vie**w の順に選択し、Plate Spreadsheet View ウインドウ（図 41）を開いてください。

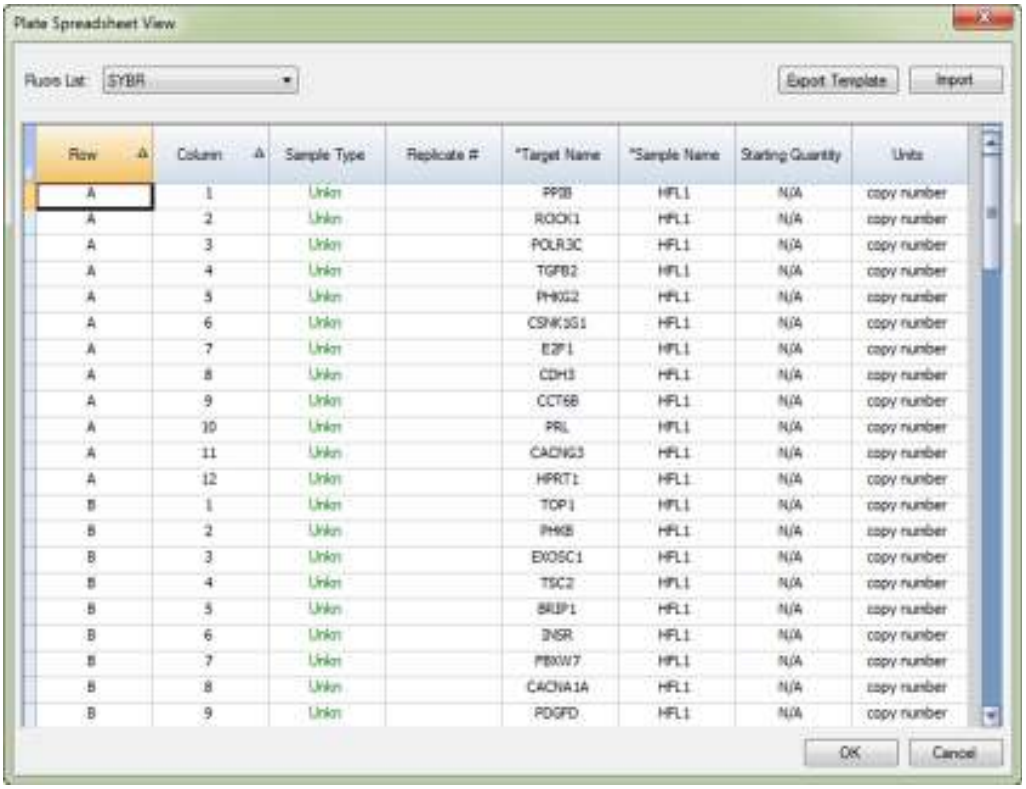


図 41　Plate Spreadsheet View ウインドウ

このスプレッドシート画面から、エクセルやその他の表計算ソフトにウェル内容情報を出力または入力することができます。

- **Import** をクリックすると、コンマ区切りファイルからウェル内容情報を入力できます。
- **Export** をクリックすると、エクセルファイル（.csv 形式）にウェル内容情報を出力できます。
- 選択している欄をソートまたは編集する場合、以下のように行います：
  - カラム名の横の菱形をクリックすることで、カラム中のデータに従ってスプレッドシートの並び順を変えます。
  - カラムトップにアスタリスク（*）がついているカラムの内容は各ウェルでクリックして入力することで編集できます。

  注意：Plate Editor を開き、メニューバーから **Settings** > **Units** を選択することで Qunatity カラムの検量線データの単位を選択します。プレートラン後、これらのスタンダードからのデータは選択した単位を元に Quantification タブ（Data Analysis ウインドウ）の Standard Curve グラフに反映されます。

スプレッドシート上で右クリックすると、以下に示すメニューから項目を 1 つ選択できます。

- **Copy**：スプレッドシート全体をコピーします。
- **Copy as Image**：画像ファイルとしてスプレッドシートをコピーします。
- **Print**：スプレッドシートを印刷します。
- **Print Selection**：選択部分のみ印刷します。
- **Export to Excel**：エクセル形式ファイルでデータ出力します。
- **Export to Text**：テキストファイルでデータ出力します。
- **Export to Xml**：.xml ファイルでデータを出力します。
- **Export to Html**：.html ファイルでデータを出力します。
- **Find**：スプレッドシート内でテキストを検索します。
- **Sort**：Sort ウインドウで最大 3 列まで選択し、並び替えします。

6 第 6 章－スタンドアローンモードでの操作

6　スタンドアローンモードでの操作

本章では、CFX96 Touch システムまたは CFX384 Touch システム のスタンドアローンモードによる操作方法について解説します。

- ホームスクリーン(67 ページ)
- ラン設定(68 ページ)
- 解析データの出力(74 ページ)
- データファイルの作成(75 ページ)
- E メールの設定(75 ページ)

ホームスクリーン

CFX96 Touch システムまたは CFX384 Touch システムを起動すると、正常に動作することを確認するセルフテストを実施し、その後ホームスクリーンが表示されます。機器を操作するためにはまずはホームスクリーンからはじめます。ホームスクリーンはすべてのシステム操作へのアクセスができ、日付と時刻、ログインしているユーザー名、サーマルサイクラー名称(初期設定はシリアル番号)と接続されている S1000 サーマルサイクラーが表示されます(図 42)。

注意:サーマルサイクラーの名称変更は、**Toos > About > Rename “Serial Number”**と続けてタッチします。

図 42　C1000 Touch ホームスクリーン

ホームスクリーン上の機能を使用するには、関連するボタンをタッチします。^^^^

- **New Protocol**:新しくプロトコールを作成します。
- **Protocol AutoWriter**:AutoWriter ツールと Ta calculator を使ってプロトコールを作成します。
- **Saved Files**:ファイルのコピー、名称変更、編集および出力します。
- **Incubate**:一定温度でのインキュベーションを行います。
- **Tools**:システム情報、E メール設定やファームウェアアップデートなどの機能が含まれます。ログイン状態によっては違うツールが使用可能になります。
  注意:タッチスクリーンは手袋を装着状態、または装着なしでも使用でき、スタイラスペンは必要ありません。ウインドウ内の収まらない内容のリストはカラムでタッチして上下にドラッグするか、矢印ボタンをタッチしてスクロールさせることができます。

ラン設定

CFX96 Touch システム または CFX384 Touch システムは、コンピュータを使用せずに リアルタイム PCR ランを行うことが可能です。USB フラッシュドライブを用いて、ランによって取得した蛍光データを取り出すことが可能です。また、C1000 Touch 本体がインターネット接続されており、E メール機能が設定されていれば、直接 E メールでデータ送信できます(74 ページの「E メールによるデータ出力」を参照)。出力したデータは、CFX Manager ソフトウェアでの解析用に使用します。

新規プロトコールの作成

1. ホームスクリーンで **New Protocol** を選択し、新規プロトコールテンプレートを開きます(図 43)。

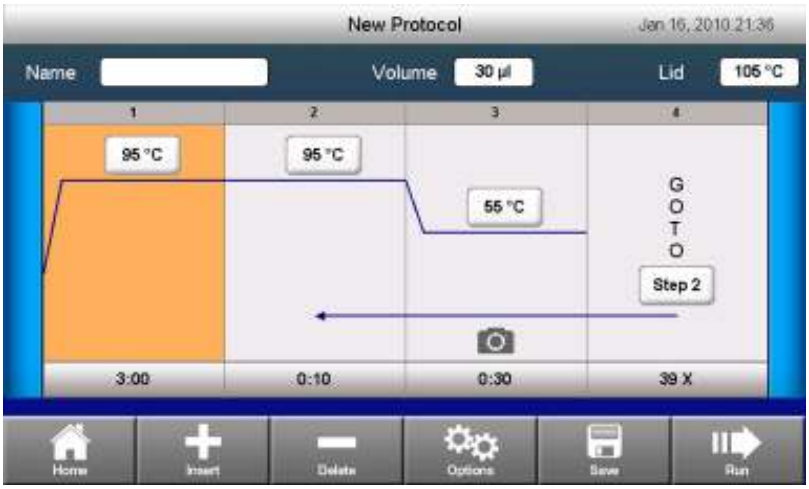


図 43 リアルタイム PCR プロトコールの初期設定プロトコール

注意:CFX96 または CFX384 オプティカルリアクションモジュールを C1000 Touch 本体にセットしている場合、初期設定として、プロトコールテンプレートにプレートリードステップが含まれています。

2. 温度ステップの目標温度および保持時間を変更する場合は、該当箇所をタッチします。表示されるキーパッドを使って新しい値を入力します。値を確定するために **OK** をタッチします。
   アドバイス:ナビゲーションの代替方法として、光学マウスを C1000 Touch サーマルサイクラー本体の USB ポートに接続して使用できます。

3. （オプション）新しいステップを挿入するには、挿入したいステップの前のステップを選択して **Insert** ボタンをタッチします。挿入できるステップは Temperature、Gradient、Goto、Plate Read、そして Melt Curve です。ステップを削除する場合は、**Delete** ボタンをタッチします（図 43）。
4. （オプション）ステップオプションを変更する場合は、ステップを選択して **Options** ボタンをタッチします（図 43）。**Step Options** ウインドウでは、温度、時間、グラジェント、ランプレート、温度増減、時間増減、プレートリードの付加/削除のパラメータを変更できます（図 44）。

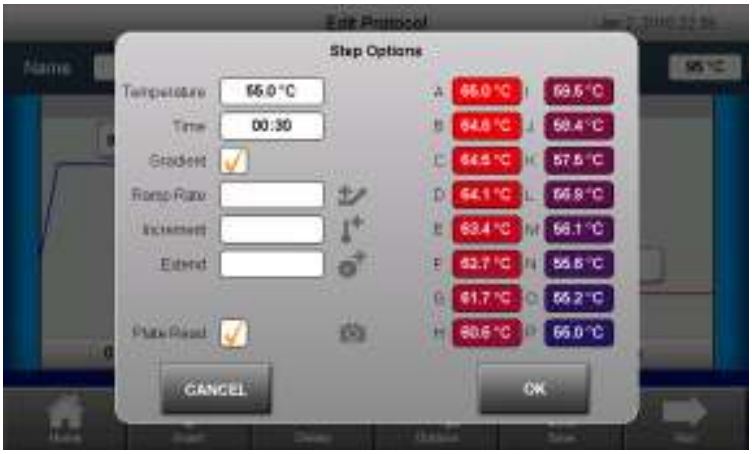


図 44 ステップオプションウインドウ

注意：グラジェント幅は 1-24℃で入力できます。一度グラジェントのステップを設定すると、Step Options スクリーンを開くことなしに、グラフィカル画面で上下温度ボタンを選択することでグラジェント温度を編集できます。

5. **GOTO** ステップにより、PCR ランでのサイクルを作成するために複数のステップがサーマルサイクラーで自動的に繰り返されます。**GOTO** ステップ を選択して、該当するボタンをタッチしてステップまたはリピート回数を変更します。

ランパラメータの変更

- サンプル容量を変更するには、Volume ボックスをタッチします（図 43）。μL 単位で新たにサンプル容量を入力します。入力したサンプル容量により、ランの実行時に使用する温度制御モードが決定されます。
  アドバイス：1～50 μL の範囲でサンプル容量を入力すると、標準モードである Temperature Control モードが自動選択されます。ゼロ（0）を入力すると、Block モードが選択されます。Temperature Control モードが推奨されます。実際のサンプル温度が高精度に得られるためです。
- 初期設定のリッド温度を変更するには、**Lid** 欄をタッチして、新たに温度を入力します（図 43）。CFX96 モジュールでは 105℃、CFX384 モジュールは 95℃がリッド温度の初期設定です。

プロトコールの保存

- プロトコールを作成すると、保存する際にオプションがあります。**Save** ボタンをタッチすると **Save As** ウインドウが表示され、名称を入力することができ、Location と Folder を指定できます（図 45）。保存するために **OK** をタッチします。

図 45 Save As ウインドウ

プロトコールの実行

1. プロトコールを実行するには、**Edit Protocol** ウインドウの **Run** ボタンをタッチします（図 43）。
2. ランで使用されるリッド温度（**Lid Temp**）、サンプル容量（**Volume**）、そしてファイル名（**File Name（.zpcr）**）を確かめます（図 46）。ランに先立ち、初期設定のスタンドアローンのデータファイル名が作成されます。

図 46 ラン確認スクリーン

3. ランでの収集される蛍光データについてチャンネルを指定するために **Scan Mode** を選択します。Scan Mode によって以下のチャンネル別でキャリブレート済みの蛍光色素が検知されます。
   - **SYBR/FAM**：チャンネル 1 からのみのデータが収集され、短時間のスキャンが可能です。
   - **All Channels**：CFX96 Touch システムではチャンネル 1–5 から、CFX384 Touch システムではチャンネル 1–4 からのデータが収集されます。

- **FRET**：FRET チャンネルからのみのデータが収集され、短時間のスキャンが可能です。

4. （オプション）**Additional Settings** ウインドウでは **User Name**、**Email Address**、**SampleID**、**Ramp Rate** の入力ができます。DNA Engine サーマルサイクラーのランプレートでのオプションも選べます。
5. ランを開始するために **OK** をタッチします。

過去に保存したプロトコールの実行

- 作成されたプロトコールをランするためには、ホームスクリーンから **Saved Files** を選択します。Locations、Folders、Files を選択した後、**Run** ボタンにタッチします（図 47）。

図 47 ランのための保存されたプロトコールの選択

- 作成されたプロトコールのパラメータを変更した場合、選択して **Edit** ボタンをタッチします。変更したプロトコールは Run ボタンをタッチすることで保存しないですぐにランすることもできますし、**Save** ボタンをタッチして保存することもできます。

ランの監視

ランが始まると、**Status** ウインドウが表示されます。ランの進行を監視するための、このウインドウの中の情報を確認します。

- **Status**: Status スクリーンは進行中のランを示し、オプションとして **View Clock**、**View Curves**、**Pause**、**Skip**、**Cancel** があります（図 48）。

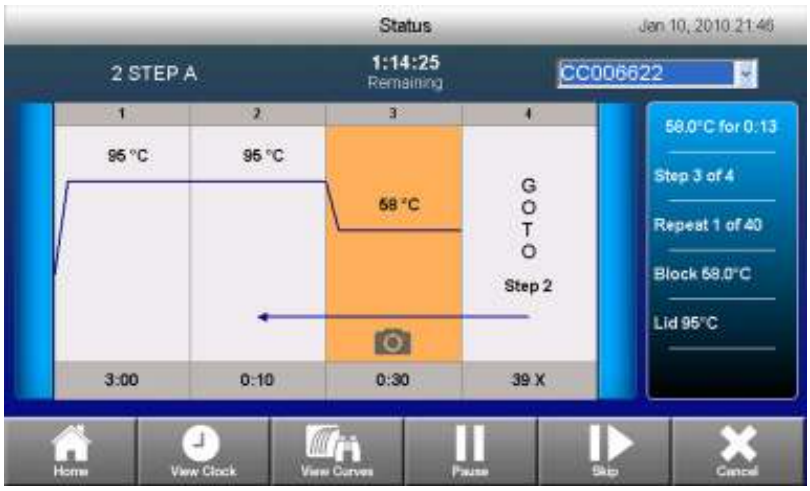


図 48 Status スクリーンでのランの監視

- **View Clock**: プロトコールのフルスクリーン表示のカウントダウンタイマーを見るためには **View Clock** ボタンを押します。Status 画面に戻るための **View Status** か、Status 画面に増幅曲線画面を見るための View Curve をタッチします。
- **View Curve**: リアルタイムのデータトレースを表示させるには、**View Curve** ボタンをタッチします(図 49)。多波長のチャンネルから収集されたデータだった場合、**Channel** ボタンを使って表示するチャンネルを選択します。1 波長のチャンネルだけのデータは一度に表示されます。プロトコールが複数データ収集ステップを持っている場合、個別のステップからのデータは **Step** ドロップダウンメニューから該当ステップを選んで表示させます。

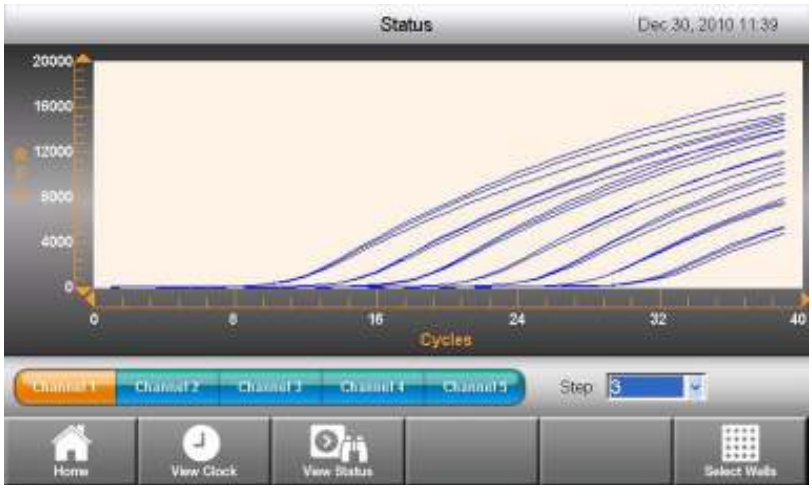


図 49 Curves スクリーンでのリアルタイムのデータトレース表示

見たい特定のウェルのトレースを表示させるには、**Select Wells** ボタンをタッチします。選択されたウェルは太い丸で示されます。初期設定はすべてのウェルが選択されています。ウェルの非選択もしくは選択は Well Selector グリッド上で該当のウェルをタッチします(図 50)。行および列の非選択もしくは選択は行および列の頭をタッチします。プレートのすべてのウェルは Well Selector グリッドの両コーナー上のアスタリスク(*)をタッチすることで選択したり、非選択したりできます。

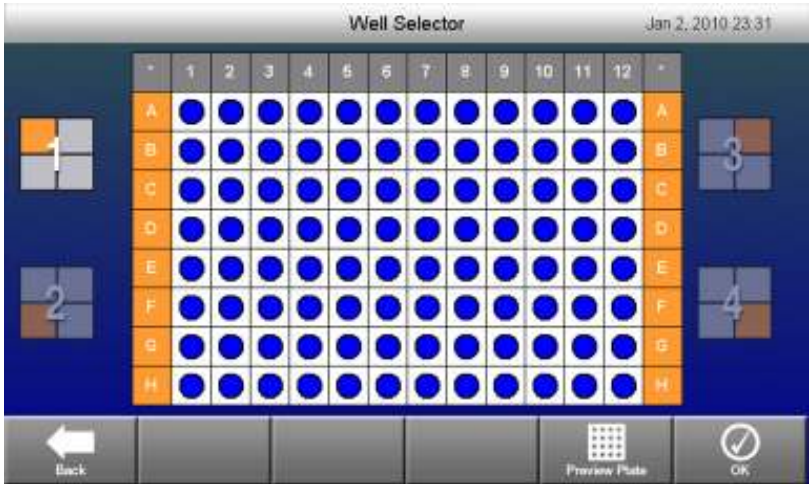


図 50　Well Selector ウインドウ

CFX96 Touch システムを使用するとき、一つの 96 ウェル Well Selector グリッドが表示されます。CFX384 Touch システムを使用したとき、一度に表示されるのはプレートの 4 分の 1 の範囲です（図 50）。それぞれの 1/4 範囲は Well Selector グリッドの各横の該当する番号のボックスをタッチすることで選択できます。**Preview Plate** ボタンをタッチすることで全 1/4 範囲を含む 384 ウェルをプレビューできます。

注意：y 軸の相対蛍光スケールは最初 0 から 1500 のスケールになっています。一度蛍光の上限を越えると、ランの残りではデータはオートスケールになります。

解析データの出力

ランが終了後、蛍光データは解析のために CFX Manager ソフトウェアにて変換する必要があります。スタンドアローンデータファイル(.zpcrd)は自動的に Saved Files ウインドウの Location カラムの Real-Time Data フォルダに保存されます。

注意:C1000 Touch サーマルサイクラーには 100 個までの PCR ランデータが保存されます。

USB フラッシュドライブを使ってのデータ出力

USB フラッシュドライブを C1000 Touch サーマルサイクラーの USB ポートに挿しておくと、ランが終了したら USB フラッシュドライブのルートディレクトリ(一番上の階層)に自動的にデータ(.zpcrd)が保存されます。

もし USB フラッシュドライブをラン終了時にサーマルサイクラーに挿していなかったら、以下の手順で従います。

1. ファイルフォルダにアクセスするために、ホームスクリーンで Saved Files にタッチします(図 51)。
2. **Location** カラムから **Real-Time Data** を選択します。
3. **File** カラムで出力したいファイルを選択します。選択したファイルの情報は Preview ペインに表示されます。
4. 出力するには、**File Options** ボタンをタッチします。
5. 接続した USB フラッシュドライブにファイルを保存するために **OK** ボタンをタッチします。

図 51 USB フラッシュドライブへ出力するリアルタイムデータファイルの選択

E メールによるデータ出力

E メール接続設定されていれば、ランの実行完了時に、C1000 Touch サーマルサイクラー本体からコンピュータに E メールによってデータを送信することができます(66 ページの「E メール設定」参照)。

ラン終了時にデータ(.zpcr)が添付された E メールを送信したい場合、ランの開始前の Additional Settings ウインドウに E メールアドレスを入力しておきます。

データファイルの作成

スタンドアローンモードによるデータファイル（.zpcr）は、解析のためにCFX Managerソフトウェア用のデータファイル（.pcrd）に変換しなければなりません。以下の手順により、スタンドアローンモードによるデータファイルを作成します。

1. メインソフトウェアウインドウ上のUSBメモリディレクトリから実験データファイル（.zpcr）をクリック&ドラッグします。または、メインソフトウェアウインドウメニュー項目から **Select File** > **Open** > **Stand-alone Run** の順に進み、ファイル（.zpcr）を選択します。
2. ソフトウェアはスキャンモードとプレートサイズにマッチしたデフォルトのプレートを選択して、.zpcr ファイルから.pcrd ファイルを生成します。そのファイルを保存する場所を選択した後、Data Analysis ウインドウが開きます。プレートレイアウトを編集するのに、ツールバーから Plate Setup を選択して、ドロップダウンメニューから必要な作業を選びます。

E メールの設定

ランの実行後、CFX Manager ソフトウェアをインストールしているコンピュータに、ランのデータファイル（.zpcr）を E メール送信できます。以下の手順により、C1000 Touch サーマルサイクラーからの E メール発信設定を行ってください。

1. C1000 Touch 本体の後面にあるポートにイーサネットケーブルを接続します。
2. ホームスクリーンにて **Log In** をタッチし、サーマルサイクラーに管理者（Admin）権限にてログインします。

   注意：ホームスクリーンに戻ると、ログインしたユーザー名が Logout ボタンの左横に表示されます。
3. ホームスクリーンの **Tools** ボタンをタッチして、ツールメニューを開きます。
4. admin メニューから、**Email Settings** をタッチします。

Gmail サーバーの設定

注意：Gmailアカウントは装置側のGmailサーバーの設定に先立って、ユーザー名、パスワードの設定をしておく必要があります。

1. **Mail Servers** ドロップダウンリストから Gmail サーバーを選択します。
2. Gmail アカウントのユーザー名とパスワードを入力します。
3. **Set As Default** チェックボックスをタッチします（図 52）。

図 52 Gmail サーバーが選択され、ユーザー名やパスワードが入力されて、E メール通信のための初期設定サーバーとして設定されている

4. 現在のサーバー設定を保存するために **Save** ボタンにタッチします。
5. **Test Email** ボタンをタッチします。
6. **Test Email Address** をタッチして、ポップアップされる英数キーパッドを使って E メールアドレスを入力します。
7. **Attachment Size in MB** 欄をタッチして、テストの添付ファイルサイズを入力します。
   注意:添付サイズの許容上限はユーザーの施設のサーバーに依存します。0.5～5 MB の添付サイズをテストすることをお勧めします。
8. **Send Email** ボタンをタッチします。テストメールがテスト用メールアドレスに送信されます。
9. サーバー設定画面に戻るには **Cancel** ボタンをタッチします。
10. Tools メニューへ戻るには **Back** ボタンをタッチします。

カスタムサーバーの設定

1. **New Server** ボタンをタッチします(図 52)。
2. **Mail Server Address** ボタンにタッチして、ポップアップされる英数キーパッドを使ってアドレスを入力する。
3. **Mail Server Port** ボタンをタッチして、ポップアップされる英数キーパッドを使って値を入力します。
4. **Set As Default** チェックボックスをタッチします。
5. サーバーによって必要であれば、追加の情報(要求される認証、SSL の使用、使用者名とパスワード)を入力します。
   アドバイス: サーバーの要求項目はユーザーご自身のネットワーク管理者にご確認ください。
6. **Save** ボタンをタッチします。新しいサーバーは **Mail Servers** ドロップダウンリストに表示されます。

7. “Gmail サーバーの設定”でのステップ 5-10 を繰り返します(76 ページ)。

サーバーの削除

1. **Mail Servers** ドロップダウンリストから削除するサーバーを選択します。
2. **Remove Server** ボタンをタッチします。
3. 選択されたサーバーの削除の確認する **Yes** ボタンをタッチします。

7 第 7 章－データ解析について

7　データ解析について

本章では、以下のデータ解析に関する機能について解説します。
・Data Analysis（データ解析）ウインドウ（79 ページ）
・Quantification（定量）タブ（82 ページ）
・データ解析設定（83 ページ）
・ウェルセレクター（86 ページ）
・グラフ（89 ページ）
・スプレッドシート（90 ページ）
・エクスポート（91 ページ）

Data Analysis（データ解析）ウインドウ

データ解析時、プレートエディタのウェル内容情報を変更してデータ表示を変更しても、ラン実行中に各ウェルから収集された蛍光データが変更されることはありません。いったんリアクションモジュールで蛍光データが収集されればそのデータそのものを削除することはできませんが、画面表示や解析から削除することが可能です。

ラン終了後にウェル内容情報を変更するには、Data Analysis ウインドウ上部の **Edit/View Plate** ボタンをクリックして Plate Editor を開いて行ってください。

- **Edi/View Plate**－レイアウトに手動で変更を加える Plate Editor を開きます。
- **Replace Plate file**－以前に保存したプレートファイルを選択して、現在のプレートレイアウトと入れ替えます。
- **Apply PrimePCR file**－PrimePCR ランファイルを選択して、プレートレイアウトに適用します。
  アドバイス:リアルタイム PCR 実験前後または実験途中にウェル内容に関する情報を追加変更することができます。スキャンモードおよびプレートサイズは、ラン開始前に設定してください。ラン終了後にこれらのパラメータを変更することができません。

CFX Manager ソフトウェアでは、ラン完了時にリアルタイム PCR データが自動的に処理されるほか、Data Analysis ウインドウが開示されてデータが表示されます。以下のいずれかの手順により、Data Analysis ウインドウで既存データのファイルを開いてください。

- メインソフトウェアウインドウ上でデータファイル（.pcrd 拡張子）をドラック&ドロップして開きます。
- Startup Wizard ウインドウの **Analyze** タブを選択して、Recent Files から選択するか、ファイルを探すために **Browse** ボタンをクリックします。
- メインソフトウェアウインドウメニューバーから **File > Open > Data File** の順に選択し、ウインドウ内のデータファイルを開きます。
- メインソフトウェアウインドウツールバーの **Data Analysis** ボタンをクリックし、ウインドウ内のデータファイルを開きます。
- **File > Recent Data File** の順に選択し、最近開いた 10 のファイルから 1 つ選択します。

Data Analysis ウインドウではいくつかのタブを表示します（図 53）。各タブでは、特別な解析方法やラン特異的な情報の解析データを示します。ランでのデータが収集されると、そのデータに種類に合わせたタブが現れます。

図 53 Data Analysis ウインドウに表示されるタブ項目

アドバイス: タブの表示を選択するには、メインウインドウの **View** のドロップダウンメニューから表示したいタブを選びます。元のタブレイアウトに戻すには、**Settings > Restore Default Windos Layout** を選択します。

Data Analysis ツールバー

Data Analysis ウインドウのツールバー（図 54）では、解析用のメイン機能を直接操作することができます。

図 54 Data Analysis ウインドウのツールバー

表 19 に、ツールバーに表示される各ボタン機能をまとめます。

表 19 Data Analysis ウインドウのツールバー

ツールバーボタン	名称	機能内容
	Plate Setup	View/Edit plate: ウェルの内容を閲覧、編集するための Plate Editor を開く。 Replace Plate file: プレートレイアウトを入れ替えためのプレートファイルを選択する。 Apply PrimePCR file: PrimePCR ランのためのプレートレイアウトに入れ替えるためにランファイルを選択する。
	Manage Well Groups	ウェルグループを作成、編集、削除するための Well Group Manager ウインドウを開く。
	Well Group	既存のウェルグループ名をプルダウンメニューから選択する。デフォルトの選択は All Wells。ウェルグループが作成されると、このメニューが表示される。
	Analysis Mode	データ解析するために Fluorophore または Target モードのいずれかを選択する。
	Help	データ解析についてのさらなる情報のためのソフトウェアヘルプを開く。

Data Analysis メニューバー

表 20 に、メニューバー項目の機能内容を示します。

表 20 Data Analysis ウインドウのメニューバー項目

メニュー項目	コマンド機能	機能内容
File	Save	ファイルを保存する。
	Save As	現在のプロトコールを別名で保存する。
	Repeat Experiment	現在のランからプロトコールとプレートファイルを抽出し、繰り返しランを行う。
	Exit	Data Analysis ウインドウを閉じる。
View	Run Log	ランログウインドウを開き、データファイルのランログを表示する。
	Quantification, Melt Curve, Gene Expression, End Point, Custom Data View, QC, Run Information	Data Analysis ウインドウでのタブ表示を選択する。少なくとも1つは選択する必要がある。
Settings	Cq Detemination Mode	各曲線で計算される Cq 値の算出法、Regeression または Single Threshold を選択する。
	Baseline Setting	選択したウェルグループに Baseline Subtraction 法を選択する。
	Analysis Mode	ベースライン閾値ウインドウを開き、ベースラインまたは閾値を補正する。
	Cycles to Analyze	解析するサイクルの範囲を選択する。
	Baseline Thresholds	ベースラインやスレッショルドを調整するための Baseline Threshold ウインドウを開く。
	Trace Styles	Trace Styles ウインドウを開く。
	Plate Setup	プレートの閲覧、編集のための Plate Editor を開く。ユーザー設定のプレートファイルもしくは PrimePCR ランファイルに現在のプレートを入れ替える。
	Include All Excluded Wells	解析に含めていなかったすべてのウェルを解析に含める。
	Mouse Highlighting	マウスカーソルによるデータを同時的に強調表示する、または強調表示しない。 アドバイス:マウスによる強調表示機能がオフにある場合は、コントロールキーを用いると一時的に強調表示することができます。
	Restore Defauld Window Layout	ウインドウの配列を初期設定に戻す。
Export	Export All Data Sheets to Excel	すべてのタブからのすべてのスプレッドシートを分割された Excel ファイルに出力する。
	Export RDML File	RDML ファイル名とロケーションを指定するための Save As ウインドウを開く。
	Custom Export…	出力する内容をカスタマイズするための Custom Export ウインドウを開く。

表 20 Data Analysis ウインドウのメニューバー項目（続き）

メニュー項目	コマンド機能	機能内容
	Export to LIMS Folder…	前もって決めていたフォーマットで LIMS フォルダにデータを保存するためのウインドウを開く。
Tools	Report…	現在のデータファイルの Report を開く。
	Well Group Reports…	特定のウェルグループについてのレポートを作成するための Well Group Report ウインドウを開く。
	Import Fluorophore Calibration	現在のデータファイルに適用させる別のキャリブレーションファイルを選択する。

Quantification（定量）タブ

Data Analysis ウインドウの各タブには、特定の解析法によるグラフおよびスプレッドシートが表示されるほか、ユーザーが表示したいデータを選択できるウェルセレクターが表示されます。Data Analysis ウインドウには、前面に Quantification タブが開きます（図 55）。このタブに表示される **Amplification**（増幅）グラフのデータを用いて、適正な実験解析設定が決定されます。

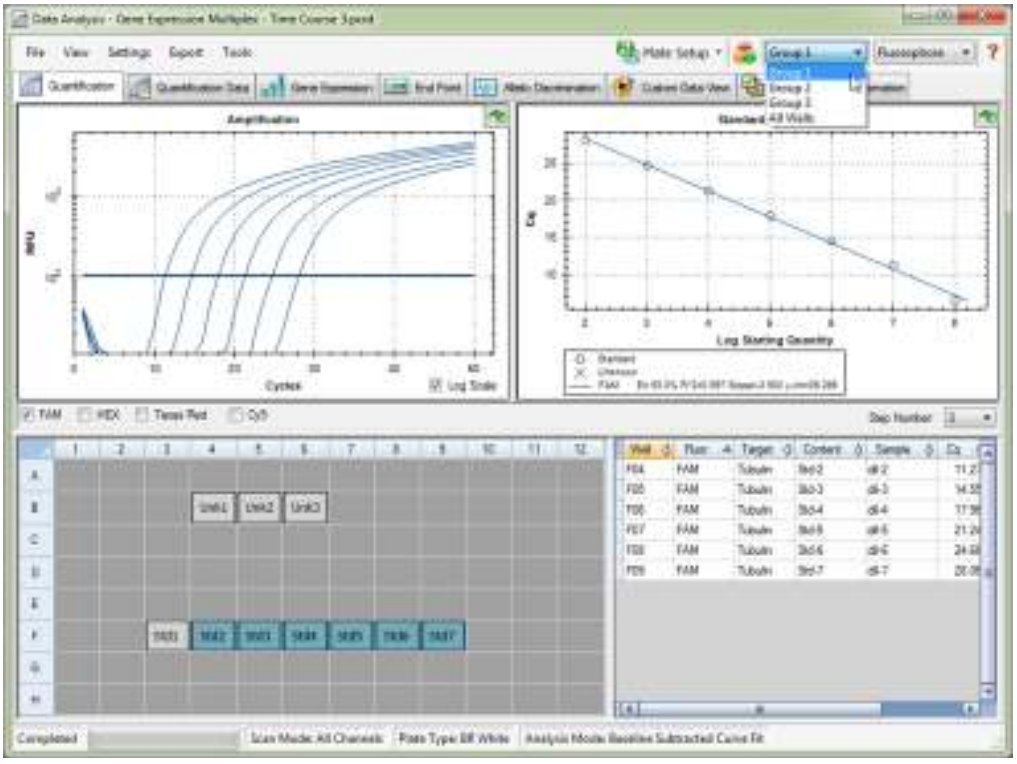


図 55 選択された Group 1 の Data Analysis ウインドウでの Quantification タブ

注意：ソフトウェアにより、各データ解析タブのペイン内のデータがリンクします。たとえば、ウェルセレクター上のウェルにマウスポインタを合わせて強調表示したウェルは、他のペイン内のデータも強調表示されます。

Step Number セレクター

CFX96 システムまたは CFX384 システムでは、複数のプロトコールステップで蛍光データを取得できます。つまり、ステップ別に取得データが保持されます。1 つ以上のデータ収集ステップがプロトコールに含まれていれば、Quantification タブの Standard Curve グラフの下部に **Step Number** セレクターが自動表示されます。ステップを選択すると、Data Analysis ウインドウに表示されるデータ全例にこの選択機能が自動的に適用されます。図 56 では、データ収集ステップが全データに対して **3** であることがわかります。

図 56　Data Analysis ウインドウでのデータ収集ステップの番号選択

Data Analysis ウインドウでの Well Group 表示

独立してデータ解析するため、プレート上でサブセットにウェルをサブセットにグループ分けすることができます。**Well Groups Manager** ウインドウでグループを作成すると(51 ページ)、Data Analysis ウインドウのツールバー上の Well Groups ドロップダウンリストにグループ名が表示されます。

> アドバイス:ウェルグループの編集、作成、削除するには、ツールバーの **Manage Well Groups** ボタンをクリックします。

初期設定では、Data Analysis ウインドウを最初に開くとウェルグループが **All Wells** で選択されて、いずれのウェルでも内容情報としてグラフおよびスプレッドシートにデータが表示されます。

図 55 は、Well Groups メニューで選択した Group 1 を示します。ウェルグループに含まれるウェルだけがウェルセレクターに内容が表示され、データ解析の計算にはこうしたウェルのデータのみが含まれます。

データ解析設定

Quantification タブ画面の Amplification グラフデータには、サイクル毎の各ウェルでの相対蛍光強度(RFU)が表示されます。グラフ上の各トレースは、1 つのウェルで単一の蛍光色素から得たデータを示します。こうしたデータを用いて、1 種類の蛍光色素ベースでの各ウェルの Cq 値が算定されます。ソフトウェアでは、Cq 値の算定に次の 2 モードが使用されます。

- **Regression** モード(回帰法):各ウェルの蛍光トレースに多変数非線形回帰モデルが適用され、このモデルから最適な Cq 値が算定されます。
- **Single Threshold** モード(単一閾値):単一閾値を用い、各ウェルの蛍光トレースの交差閾値ポイントに基づいて Cq 値が算定されます。

Cq 値算定モードを選択するには **Settings > Cq Determination Mode** を選びます。

Threshold(閾値)の調整

Single Threshold モードでは、以下の手順により、Amplification グラフ上の Threshold Line をクリックし、マウスポインタを上下に移動させて、蛍光色素の Threshold を調整してください。

複数の蛍光色素の正確な交差閾値を設定するためは、蛍光色素ごとに閾値を調整してください。

1. Amplification グラフ下の蛍光色素名称横のボックスをクリックして、Quantification タブ画面(図 50)にある蛍光色素セレクターから蛍光色素を 1 つ選択します。

2. メニューバーから **Setting >Baseline Threshold** の順に選択して、Baseline Threshold ウインドウを開きます。

3. **User Defined** ボタンをクリックし、Threshold の値を入力して該当する蛍光色素の交差閾値を調整します（図 57）。

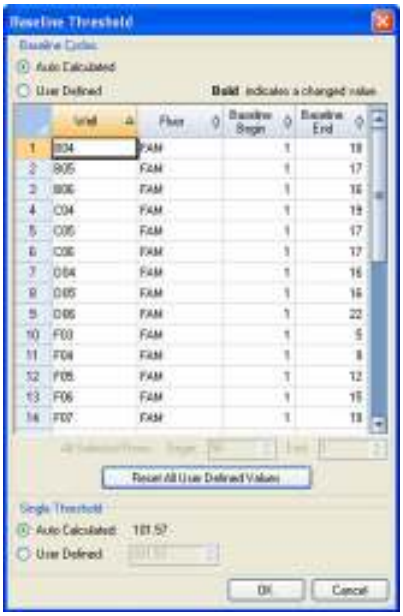


図 57 Baseline Threshold ウインドウ

4. OK をクリックして変更内容を確定し、ウインドウを閉じます。

ベースラインの設定

ソフトウェアにより、ウェル別にベースラインが自動設定されます。すべての蛍光曲線についてベースライン補正の方法を決めるために Baseline Settings を選択します。以下の3つのオプションを選択するために **Settings > Baseline Setting** を選択します。

- **No Baseline Subtracted（ベースライン補正なし）**：ベースライン補正されていない相対的蛍光強度のトレースとしてデータが表示されます。解析の一部ではこのモードが使用できません。このため、Gene Expression、End Point および Allelic Discrimination タブ画面は表示されません。
- **Baseline Subtracted（ベースライン補正あり）**：ウェルの蛍光色素別でベースライン補正されたトレースとしてデータ表示されます。定量サイクル、検量線の作成、濃度不明サンプルの濃度測定を行うには、ソフトウェアによってデータがベースライン補正されなければなりません。ベースライン補正トレースを作成するには、ベースラインサイクル時に得られた各ウェルの蛍光強度トレースを通して最良の直線が自動的に適用されます。その後、各サイクルで背景補正データから最良の直線を適用したデータが差し引かれます。
- **Baseline Subtracted Curve Fit（ベースライン補正曲線フィット）**：ベースライン補正トレースとしてデータが自動表示されるほか、中心化平均フィルター（centered mean filter）を用いたベースライン補正曲線がスムーズ化されます。このプロセスにより、Cq 値はそれぞれ不変値となります。

上記のうち後の2つについてのは、以下のオプションを選択できます：

- **Apply Fluorescent Drift Correction（蛍光ドリフト補正適用）**:ランの最初数サイクル中に RFU 値が異常にドリフトしているウェルに対して、ソフトウェアは付近のウェルから予想されるベースラインを引き出し、水平のベースラインを作成します。

ベースラインの調整

解析のウェルを選択して、それらのウェルのベースライン設定をチェックします。Baseline Threshold ウインドウ（図 57）を開き、選択したウェルの初期設定ベースラインを変更します。このウインドウを開くためには:

1. Amplification グラフ下に位置する蛍光色素名のボックスをチェックすることで、Quantification タブ（図 55）でひとつの蛍光色素を選択します。
2. Baseline Threshold ウインドウを開くために、**Setting >Baseline Threshold** の順に選択します。

各ウェルでの最初と最後のベースラインのサイクルを調整するために:

1. Baseline Cycles ペインで、行番号をクリックして一つ以上のウェルを選択するか、すべてのウェルを選択するためには上左隅をクリックするか、複数の分かれたウェルを選択するには Control キーを押さえたまま、もしくは複数のつながったウェルを選択するには Shift キーを押さえたまま行番号をクリックします。
2. 選択したウェルに対して **Baseline Begin** サイクルと **Baseline End** を調整するか、スプレッドシートの底にある **Begin** と **End** サイクル数を変更します（図 57）。
3. 最後に保存した値に設定を戻したい場合、**Reset All User Defined Values** をクリックします。
4. 変更を確認して **OK** をクリックして、ウインドウを閉じます。
   アドバイス: すべてのデータファイルのベースラインを同じサイクルレンジに固定するためには、**User Preferences** ウインドウの **Data Analysis** タブで Baseline を定義します。この値はその後作成されるデータファイル全てに適用されます。

Analysis Mode

データを蛍光色素別またはターゲット名別で解析し、表示できます。データ解析モードを選択するために、**Settings > Analysis Mode** を選択するか、ツールバーにある **Analysis Mode** ドロップダウンメニューから選択します。

Fluorophore を選択したときは、データトレースはプレート設定で示された蛍光色素別で表示されます（図 58）。個々の蛍光色素データは amplification と standard curve（スタンダードがあれば）グラフに表示され、amplification グラフの下にあるチェックボックスにより表示される蛍光色素のデータを選択できます。

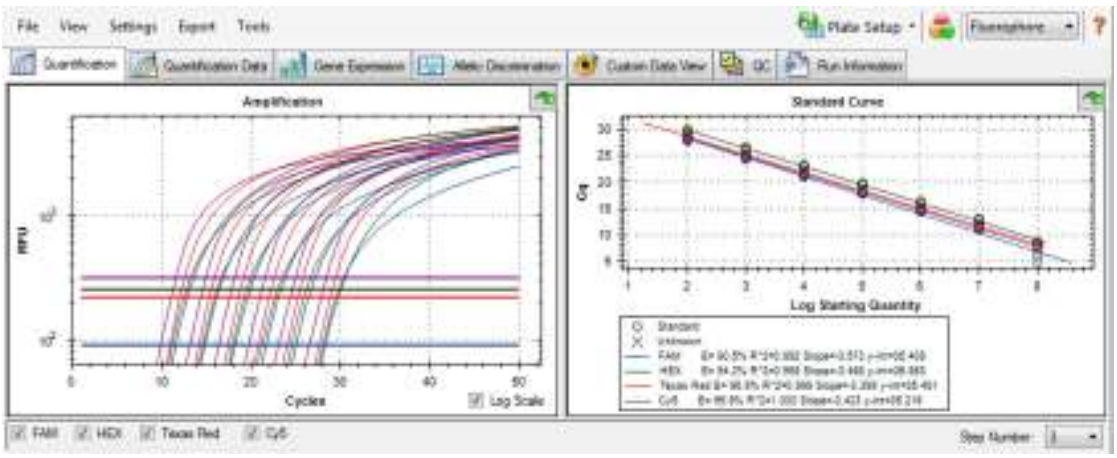


図 58 Fluorophore 解析モード選択時

Target を選択すると、データトレースはプレート設定で入力したターゲット名別で表示されます(図 59)。

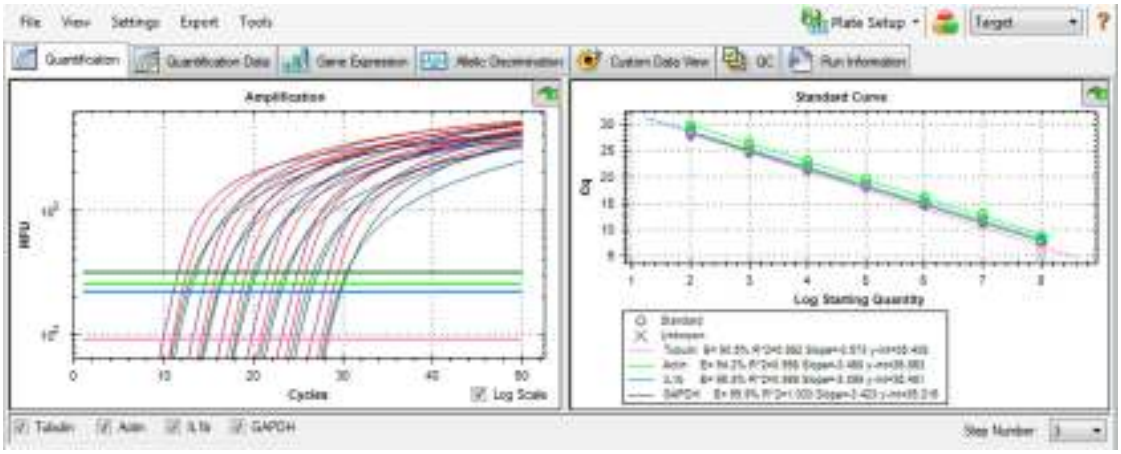


図 59 Target 解析モード選択時

Cycles to Analyze

特定のサイクルレンジにデータ解析を制限したい場合、**Settings > Cycles to Analyze** を選択する。矢印ボタンを使って、もしくは設定したい値を入力して Enter キーを押して、開始サイクルと最終サイクルを選択します。**Restore Defaults** ボタンをクリックして、解析に使用する元のサイクルに戻します。

注意:ランの最初からサイクルを除くことでベースラインに顕著な影響を与えます。

ウェルセレクター

ウェルセレクター内のウェルをクリックすると、以下の方法によって、Data Analysis ウインドウに表示されるグラフやスプレッドシートデータを表示・非表示することができます。

- 1 つのウェルを非表示にする場合は、そのウェルのみ強調表示してクリックします。このウェルを表示する場合は、再び強調表示してクリックします。

- 複数のウェルを非表示にする場合は、希望するウェル群をクリック&ドラッグします。このウェル群を表示する場合は、再び強調表示してクリックします。
- ウェルをすべて非表示にする場合は、プレートの左上隅部分をクリックします。表示するには、再び左上隅をクリックします。
- ウェル列またはウェル行を非表示にする場合は、列または行の最初の部分をクリックします。表示するには、同部位を再びクリックしてください。

ウェルセレクターでは、内容情報(Plate Editor で情報入力した情報)を含むウェルのみ選択可能です。選択されている場合は、表示色が変わります。図 60 に示すとおり、ウェルセレクターには、以下の 3 タイプのウェルが表示されます。

- **選択かつ設定ウェル(青色):**この各ウェルには、設定された **Unk(不明)**サンプルタイプが含まれます。このウェルから得られたデータは Data Analysis ウインドウに表示されます。
- **未選択かつ設定ウェル(薄いグレー色):**この各ウェルには、設定済み **Std(標準)**および **Pos(陽性対照)**サンプルタイプが含まれます。未選択ウェルから得られたデータは、Data Analysis ウインドウには表示されません。
- **未設定ウェル(濃いグレー色):**この各ウェルには、Plate Editor ウインドウで内容情報が入力されていません。

図 60 ウェルセレクターで表示される 3 タイプのウェル色

ウェルセレクターでの右クリックメニュー項目

ウェルセレクター上の右クリックで表示される項目を表 21 に示します。

表 21. ウェルセレクターでの右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Well XX	**このウェルだけ表示、このウェルを表示から削除、このウェルの色を設定、解析からこのウェルを除外**
Selected Wells(右クリック&ドラッグ)	**これらのウェルだけ表示、これらのウェルを表示から削除、これらのウェルの色を設定、解析からこれらのウェルを除外**
Copy	**クリップボードに、サンプルタイプや任意の複製番号などのウェル内容情報をコピーする。**
Copy as Image	**セレクター表示を画像でコピーする。**
Print…	**セレクター表示をプリントアウトする。**
Print Selection	**現在の選択でプリントする。**
Export to Excel…	Excel スプレッドシートにデータを出力
Export to Text…	テキストファイルにデータを出力
Export to Xml…	.xml ファイルにデータを出力
Well Labels	ウェルラベルとして Sample Type、Target Name または Sample Name に変更できる。

データ解析からの一時的ウェル除外

以下の手順により、データ解析からウェルを一時的に除外することができます。

右クリックのオプション機能

1. 蛍光データのトレース上、または検量線上にプロットしたポイント上で、ウェルセレクターに表示されるウェルを右クリックします。また複数のウェルを除外するためには、右クリック&ドラッグで複数のウェル、トレース、ポイントを選択します。
2. 右クリックメニューの選択項目から適したオプションを選択します:
   Well > Exclude Well
   Selected Wells > Exclude from Analysis
   Selected Traces > Exculde these wells from Analysis

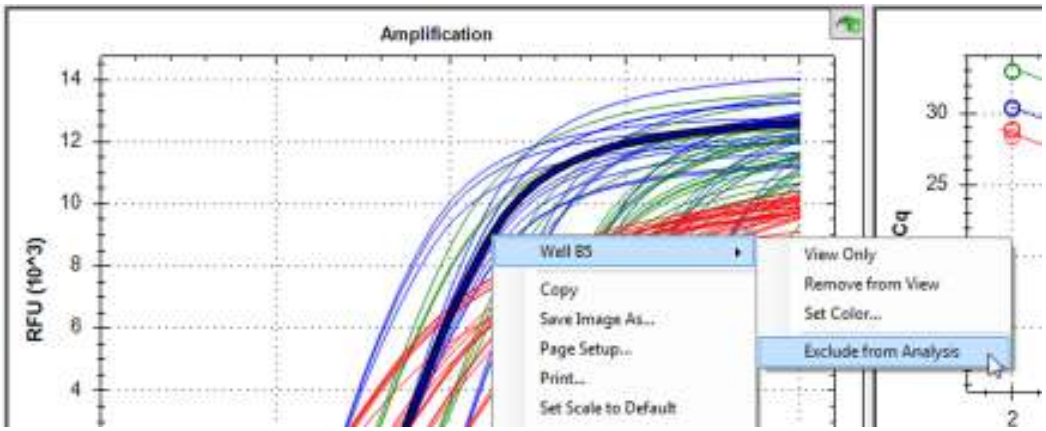


図 61　右クリックによる解析からのウェル除外

注意:除外ウェルを再び解析に含める場合、対象のウェルをウェルセレクターでクリックして、右クリックし、**Include Well XX in Analysis** を選択します。

Plate Editor を使用した場合

1. Data Analysis ウインドウのツールバーから **View/Edit Plate** ボタンをクリックします。
2. ウェルセレクターに表示されるウェルを 1 つまたは複数選択します。
3. **Exclude Wells in Analysis**(図 62)のボックスをクリックし、選択したウェルを除外します。このチェックボックスは、ウインドウ右側の Plate Editor コントロールの下方にあります。

図 62 ペイン下部の Exclude Wells in Analysis チェックボックス

4. 除外ウェルは Plate Editor ウインドウのアスタリスク(*)の印がついています。

別の方法として、解析からウェルを完全に除去する場合は、**Clear Wells** ボタンをクリックし、Plate Editor 内のウェルから内容情報をすべて消去します。

警告！一度消去したウェルの内容情報を回復させることはできません。

グラフ

Data Analysis ウインドウに表示される各グラフには、各種のグラフデータのほか、データ補正用のオプション機能が含まれます。表示されるグラフを拡大するには、希望する領域をマウスでクリック&ドラッグして選択してください。その場合、自動的にグラフサイズが調節され、センタリング表示されます。

アドバイス:グラフ全体表示に戻す場合は、右クリックし、同メニューから **Set Scale to Default** を選択してください。

右クリックメニュー項目

いずれのグラフでも右クリックによる選択項目が使用できます。いずれのグラフでも利用できる項目が部分的に表示されます。こうした選択項目によって、データ表示方法を変更し、あるいはグラフからのデータ取り出しを簡単にします(表 22)。

表 22 グラフでの右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	クリップボードにグラフをコピーする。
Save Image As…	選択した画像ファイルにグラフ表示画像を保存する。画像形式は PNG(初期設定)、GIF、JPG、TIF または BMP の各フォーマットから選択できる。
Page Setup	印刷用ページ設定をプレビューし、選択する。
Print	グラフをプリントする。
Show Point Values	グラフ上のポイントでマウスを移動する場合に、ポイント値を表示する。
Set Scale to Default	グラフ拡大後に初期設定サイズにグラフを戻す。
Chart Options…	グラフオプションウインドウを開いて、グラフタイトルの変更、x 軸および y 軸での制限値の選択、グリッドラインの表示、座標軸の小目盛の表示などを行う。

グラフはペインの上右隅のアイコンをクリックして、ドラッグし、目的とする場所で離すことで、Microsoft Word や PowerPoint ドキュメントにコピーすることができます。画像解像度は画像が得られた、スクリーン解像度によります。

注意：特別なグラフで適用されるメニュー項目は、次章の「Data Analysis ウインドウ（83 ページ）」で解説します。

スプレッドシート

Data Analysis ウインドウに表示されるスプレッドシートには、以下のいずれかの方法によってデータ並び替えなどを行う機能があります。

- 選択した表の新たな位置に列をクリック＆ドラッグします。
- 列のヘッダーをクリックすることにより、昇順または降順にデータを並び替えします。

ソートウインドウにて最大 3 列のデータを並び替えする場合は、以下の手順で操作してください。

1. スプレッドシート上で右クリックしてメニューを開き、**Sort** を選択します。
2. ソートウインドウで、第一列のタイトルを選択します。昇順または降順にデータを並び替えます。
3. プルダウンメニューのタイトルを選択し、1 列以上のタイトルを選択します。**Ascending**（昇順）または **Descending**（降順）を選択して、選択した順で並び替えします。
4. **OK** をクリックして並び替えデータを確定します。並び替えを中止する場合は、**Cancel** をクリックします。

列にマウスポインタを保持することにより、関連するグラフおよびウェルセレクターでデータを強調表示することができます。その強調表示した列で右クリックすると、別のソフトウェアプログラムにデータ内容をコピー＆ペーストできます。

スプレッドシート用の右クリックメニュー主要項目

スプレッドシート上で右クリックすると、以下の表 23 に示すメニュー項目を選択できます。

表 23 スプレッドシート用の右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	**選択したウェルの内容情報をクリップボードにコピーします。続いて、Excel などのスプレッドシートに情報をペーストします。**
Copy as Image	**スプレッドシート表示を画像ファイルとしてコピーした後、テキスト、画像またはスプレッドシードファイルなどの画像ファイルが受入れ可能なファイルにペーストします。**
Print…	**現在のスプレッドシート表示を印刷します。**
Print Selection…	**現在の選択部分のみ印刷します。**
Export to Excel…	**Excel のスプレッドシートにデータ出力します。**
Export to Text…	**テキストファイルにデータ出力します。**
Export to Xml…	**Xml ファイルにデータ出力します。**
Export to Html…	**Html ファイルにデータ出力します。**
Find…	**テキストを検索します。**
Sort…	**ソートウインドウで最大 3 列まで選択し、並び替えします。**
Select Columns…	**スプレッドシートに表示するカラムを選択します。**

エクスポート(データ出力)

4 つの出力オプションは **Export** ドロップダウンメニューからアクセスできます。

Excel へのすべてのデータシート出力

個々の Excel ファイルに CFX Manager ソフトウェアのすべてのタブからのスプレッドシート表示すべてを出力するためには、**Export > Export All Data Sheets to Excel** を選択します。

RDML ファイル出力

Real-Time PCR Data Markup Language(RDML)フォーマットファイルとして、Save As ウインドウを開き、ファイルの名前と場所を特定するためには、**Export > Export RDML Files** を選択します。RDML は定量 PCR のデータを交換するための構造的なかつ普遍的なデータ基準です。データ基準は Extensible Markup Language(.xml)フォーマットのテキストファイルです。RDML データ交換フォーマットについて追加情報は RDML コンソーシアムウェブサイト(www.rdml.org)を参照してください。

カスタム出力

出力するフィールドとファイルフォーマットをカスタマイズするためのウインドウを開くためには **Export > Custom Export** を選択します。

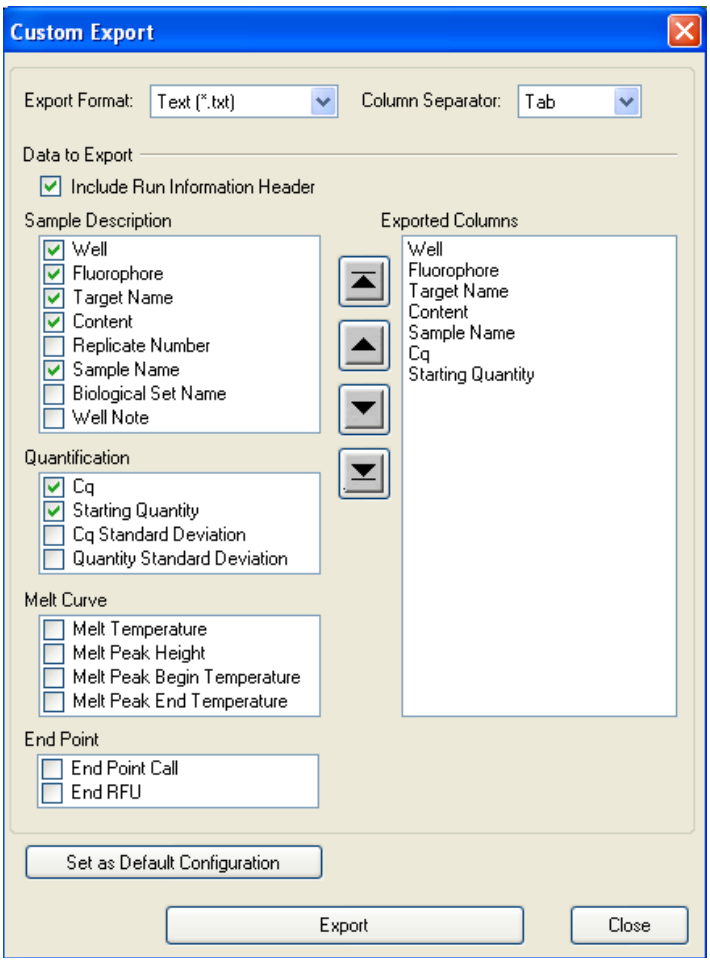


図 63 カスタム Export ウインドウ

1. 以下のファイルのエクスポートフォーマット(Text 形式 *.txt、CSV 形式 *.csv、Excel 2007 形式 *.xlsx、Excel 2003 形式 *.xls、XML 形式 *.xml、HTML 形式 *.html)からエクスポートフォーマットを選択します。
2. 適切なチェックボックスをチェックして、出力するアイテムを選択します。
3. Save As ウインドウを開き、エクスポートするファイルの名前と場所を特定するためには Export ボタンをクリックします。

LIMS フォルダへの出力

予め定義された**LIMS folder**の場所に保存されるLIMS互換のファイルフォーマットについて、Save As ウインドウを開き、エクスポートするファイルの名前と場所を特定するためには **Export > Export to LIMS Folder** を選択します。LIMS ファイルの作成、管理、使用についてのさらなる情報は、LIMS 統合を参照してください(161 ページ)。

第 8 章－Data Analysis ウィンドウ

8 Data Analysis ウィンドウ

本章では、以下に示す Data Analysis ウインドウで使用するタブに関する取り扱いについて解説します。

- Quantification（定量）タブ（94 ページ）
- Quantification Data（定量データ）タブ（99 ページ）
- Melt Curve（融解曲線）タブ（102 ページ）
- Melt Curve Data（融解曲線データ）タブ（104 ページ）
- End Point タブ（106 ページ）
- Allelic Discrimination（対立遺伝子識別）タブ（108 ページ）
- Custom Data View タブ（111 ページ）
- QC タブ（112 ページ）
- Run Information（ラン情報）タブ（113 ページ）
- データファイルレポート（114 ページ）
- Well Group レポート（117 ページ）

注意: Data Analysis ウインドウに表示されているタブは View メニューで選択してカスタマイズすることができます。このレイアウトはファイルに保存されます。

Quantification（定量）タブ

Quantification タブ画面（図 64）に表示されるデータを使用して、個別ウェルのベースライン設定および閾値設定などの解析条件を設定します。Quantification タブでは、次の 4 タイプによるデータが表示されます。

- **Amplification グラフ：**サイクル毎での各ウェルの蛍光強度（相対値）が表示されます。グラフの各トレースは、1 個のウェルで単一の蛍光色素から得られたデータを示します。
- **Standard curve：**実験にサンプルタイプとして Standard と設定されたウェルが含まれる場合に限り、このグラフが表示されます。初期量の log に対してプロットした定量サイクルによる検量線を示します。解説部分には、Standard サンプルタイプのウェルで各蛍光色素での反応効率（E）が表示されます。
- **Well selector（ウェルセレクター）：**表示したい蛍光データが得られているウェルを選択します。
- **Spreadsheet（スプレッドシート）：**選択したウェルで収集されたデータをスプレッドシートに表示します。

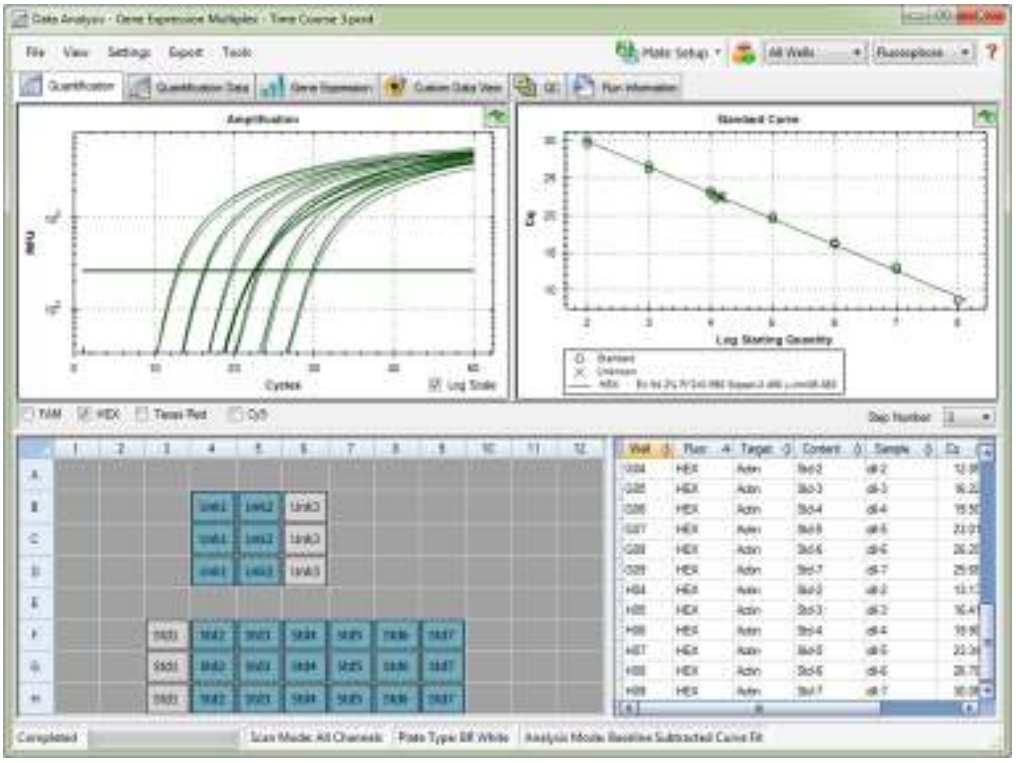


図 64 Data Analysis ウインドウでの Quatification タブのレイアウト

Fluorophore Selector

蛍光色素を 1 つまたは複数で選択するには、Quantification タブ画面の Amplification グラフ下の Fluorophore Selector をクリックしてください。蛍光色素名の横にあるボックスをクリックすると、Data Analysis ウインドウ中で蛍光色素のデータを表示または非表示することができます。

Trace Styles(トレーススタイル)ウインドウ

Trace Styles ウインドウ(図 65)を開くと、Quantification タブおよび Melt Curve タブ上の Amplification グラフ／Melt Curve グラフのトレース表示を調整することができます。

以下の手順により、このウインドウを開いてください。

1. Amplification グラフ下の蛍光色素選択ボックス(86 ページ図 58)から蛍光色素を 1 つ選択します。
2. Data Analysis ツールバーの **Trace Styles** ボタンをクリック、または Data Analysis メニューバーから **Settings > Trace Styles** の順に選択、またはトレースの上で右クリックして **Trace Styles** を選択します。

■Data Analysis ウィンドウ

図 65 Trace Styles ウインドウ

Trace Styles ウインドウのツールを使用して、トレース表示を変更し、同ウインドウ下部のウェルセレクターで変更結果をプレビューすることができます。

- ウェルセレクターを使用し、特定のウェル群を選択します。別の方法として、**Wells** 列のプルダウンメニューにあるサンプルタイプを 1 つ含むウェルを選択します。
- Color 列のボックスをクリックし、トレース色を 1 つ選びます。
- Symbol 列のプルダウンメニューから標識記号を選択します。
- **Color Quick Set** はボタンラベルにより示されるルールでウェルの色を指定することができます。:Random by Well(ウェルごとにランダム)、Random by Replicate(利プリケーごとにランダム)、Use Fluor Colors(蛍光色素ごと)、Use Target Colors(ターゲットごと)、Use Sample Colors(サンプルごと)
- Sample Type、Target Name、Sample Name、Symbol のいずれかをクリックすることで、**Well Labels** を選択します。

対数スケールのオプション機能

グラフ下の **Log Scale** ボックスをクリックすると、図 66 に示すとおり、半対数スケールで表示されます。

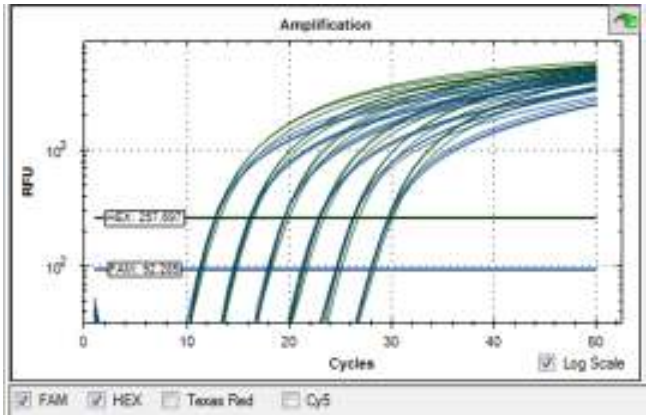


図 66 Amplification グラフで Log Scale オプションが選択された状態

アドバイス:検量線グラフのいずれかの領域を拡大する場合には、グラフ上の希望する

領域をマウスでクリック&ドラッグしてください。グラフ全体表示に戻す場合は、右クリックし、メニューから **Set Scale to Default** を選択してください。

Stardard Curve グラフ

このソフトウェアでは、ランでの 1 つの蛍光色素に対して Standard（Std）サンプルタイプを実験データに含まれていると、Quantification タブ画面に Standard Curve グラフ（図 67）が作成されます。

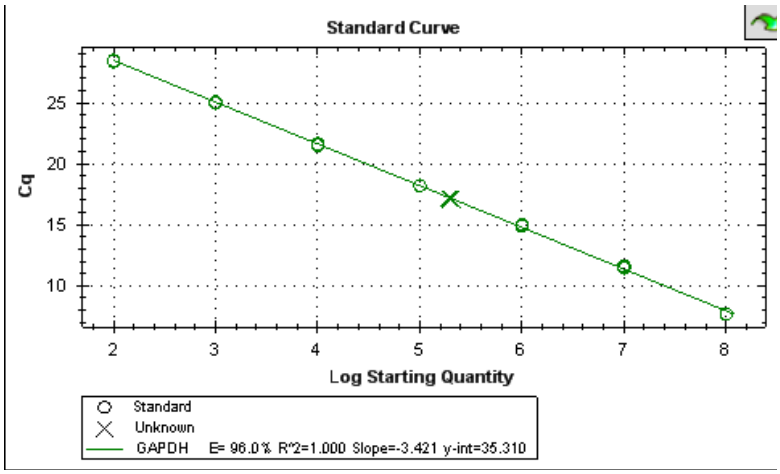


図 67 Standard Curve グラフ

Standard Curve グラフには、以下の情報が表示されます。

- 各曲線に関する名称（蛍光色素またはターゲット名称）
- 各蛍光色素とターゲットの色
- 増幅効率（E）：マルチプレックスリアクションを最適化するための値ともなります。
  注意：増幅効率（E）とは、プロトコールの各サイクルでどの程度ターゲット遺伝子が増幅されるかを示す指標です。この数値が 100%であれば、各サイクルによってターゲット遺伝子が 2 倍に増幅されていることを意味します。
- 相関係数、R^2（R^2 として記載）：検量線がどの程度データとしての信頼性があるか（フィット良好性）を評価するための値として使用します。
- Slope
- Y-intercept

右クリックメニュー項目

コピー、印刷、グラフデータ出力などの右クリックメニューの主要項目に加えて、表 24 に Amplification グラフのみ選択できる項目を示します。

表 24 Amplification グラフに限定される右クリックメニュー項目

メニュー項目	機能内容
Well XX, Fluor/Target	この well のみ表示、表示からこのウェルを削除、このトレースの色の設定、解析からこのウェルの排除。
Selected Traces	これらのウェルのみ表示、表示からこれらのウェルを削除、これらのトレースの色の設定、解析からこれらのウェルの排除。
Show Threshold Values	グラフ上に増幅曲線の閾値を表示する。
Trace Styles	トレーススタイルウインドウを開き、Quantification タブおよび融解曲線タブに表示されるトレーススタイルを変更する。

表 24 Amplification グラフに限定される右クリックメニュー項目(続き)

メニュー項目	機能内容
Baseline Thresholds...	Baseline Thresholds ウインドウを開き、各蛍光色素のベースラインまたは閾値を変更する(Quantification タブの Amplification グラフ表示の変更)。

Quantification タブスプレッドシート

表 25 に、Quantification タブ画面右下のスプレッドシートに表示される項目をまとめます。

表 25 Quantification タブスプレッドのデータ項目

情報項目	内容
Well	プレート内でのウェル位置
Fluor	検出された蛍光色素
Target	Plate Editor ウェルに割り当てられた Target Name
Content	Plate Editor で割り当てられた Sample Type(必須)およびリプリケート番号(オプション)の組み合わせ
Sample	Plate Editor ウェルに割り当てられた Sample Name
C_q	各トレースに対する Quantification サイクル

アドバイス: Content、Target、Sample の内容情報を変更するには、**View/Edit Plate** ボタンをクリックして、Plate Editor を開いてください。

Quantification(定量データ)タブ

Quantification タブ画面には、各ウェルで収集された定量データが表示されたスプレッドシートが示されます。以下に示す 4 種類のデータ表示方法から 1 つ選択してください。

- **Results(結果):**得られたデータをスプレッドシートで表示します。
- **Standard Curve Results(検量線結果):**検量線のデータをスプレッドシートで表示します。
- **Plate(プレート):**プレートマップで各ウェルのデータを表示します。
- **RFU(蛍光強度相対値):**サイクルごとの各ウェルでの RFU 定量値をスプレッドシートで表示します。
  アドバイス:並べ替え機能など、スプレッドシート上で右クリックによる選択機能を利用できます。

Results スプレッドシート

データ結果に関するスプレッドシート(図 68)を選択すると、プレート内の各ウェルに関するデータ表が表示されます。

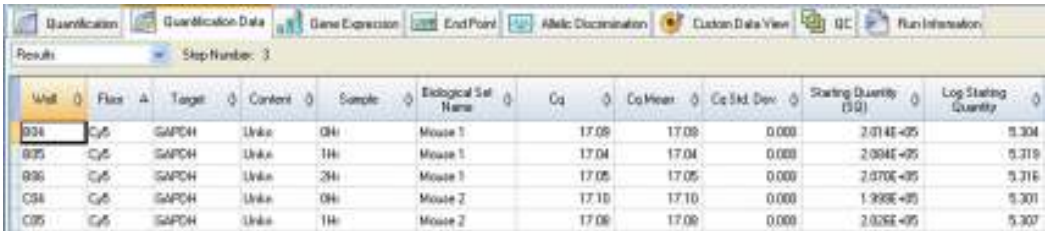


図 68 Results スプレッドシートが選択された Quantification Data タブ

注意:Plate Editor ウインドウのウェルに割り付けられたリプリケートグループで Std. Dev

（標準偏差）計算が適用されます。この計算により、リプリケートグループの各ウェルに対する Cq の平均値が得られます。

表 26 に、結果に関するスプレッドシートに表示されるデータ内容をまとめます。

表 26 結果に関するスプレッドシートに示される情報

情報項目	内容
Well	プレート内でのウェル位置
Fluor	検出された蛍光色素
Target	増幅ターゲットの名称
Content	サンプルタイプおよび複製番号
Sample	サンプル内容
Biological Set Name	生物学的セットの名称
Cq	定量サイクル
Cq Mean	リプリケートグループでの定量サイクルの平均値
Cq Std. Dev	リプリケートグループでの定量サイクルの標準偏差
Starting Quantigy (SQ)	ターゲットの予想初期量
Log Starting Quantity	初期量のログ値
SQ Mean	初期量の平均値
SQ Std. Dev	初期量の標準偏差
Set Point	グラジェントステップのウェルでのサンプルの温度
Sample Note	サンプルに関するメモ

Standard Curve Results スプレッドシート

Standard Curve Results スプレッドシート（図 69）を選択すると、算出された検量線のパラメータが表示されます。

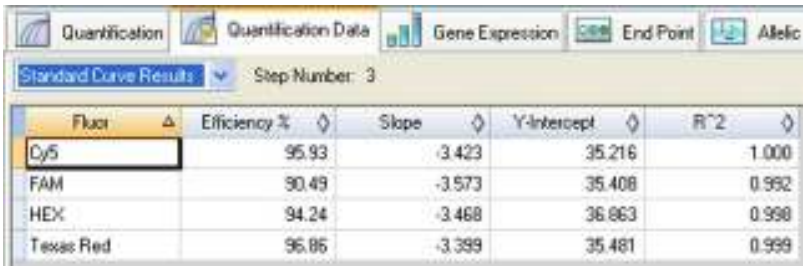


図 69 Quantification Data タブでの Standard Curve Results スプレッドシート

これらの値は右クリックして、**Copy** を選択することでドキュメントにコピー＆ペーストが可能、また **Export** オプションのひとつを選ぶことでファイルを作成できます。

表 27 Standard Curve Results スプレッドシートに示される情報

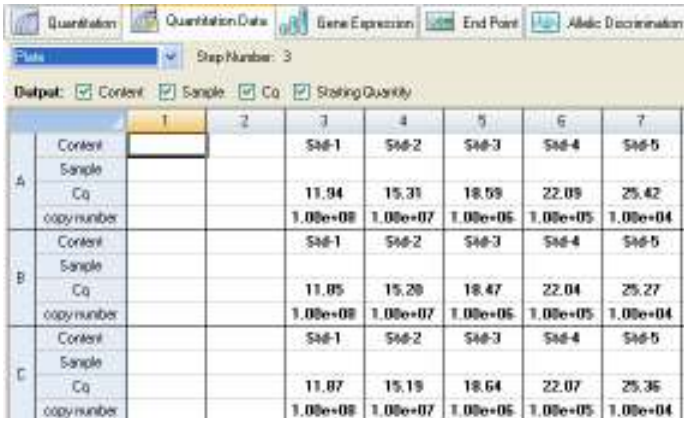
情報項目	内容
Fluor (or Target)	検出された蛍光色素（またはターゲット）
Efficiency %	増幅効率
Slope	検量線の傾き
y-intercept	検量線の Y 軸切片

表 27 Standard Curve Results スプレッドシートに示される情報(続き)

情報項目	内容
R^2	相関係数

Plate スプレッドシート

Plate スプレッドシートを選択すると、1 種類の蛍光色素に関するデータをプレートマップで一度に表示できます。スプレッドシートの下部にあるタブをクリックすることで各蛍光色素を選択します。図 70 は、プレートマップとして表示されたプレートスプレッドシートを示します。

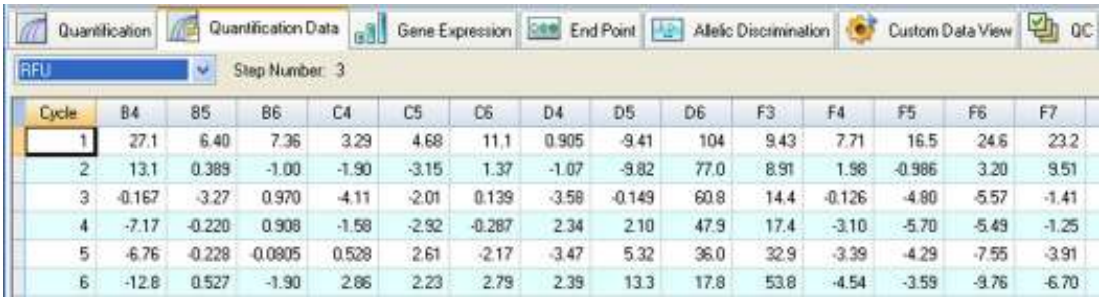


		1	2	3	4	5	6	7
A	Content			Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
	Sample							
	Cq			11.94	15.31	18.59	22.09	25.42
	copy number			1.00e+08	1.00e+07	1.00e+06	1.00e+05	1.00e+04
B	Content			Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
	Sample							
	Cq			11.85	15.20	18.47	22.04	25.27
	copy number			1.00e+08	1.00e+07	1.00e+06	1.00e+05	1.00e+04
C	Content			Std-1	Std-2	Std-3	Std-4	Std-5
	Sample							
	Cq			11.87	15.19	18.64	22.07	25.36
	copy number			1.00e+08	1.00e+07	1.00e+06	1.00e+05	1.00e+04

図 70 Quantification タブ画面上で Plate スプレッドシート

RFU スプレッドシート

RFU スプレッドシートを選択することで、ランのサイクルごとの各ウェルで得られた相対蛍光ユニット(RFU)を見ることができます。スプレッドシートの下部のタブをクリックすることで個々の蛍光色素を選択します。ウェル番号は各列の一番上に、サイクル番号は各行の左に表示されます(図 71)。



Cycle	B4	B5	B6	C4	C5	C6	D4	D5	D6	F3	F4	F5	F6	F7
1	27.1	6.40	7.36	3.29	4.68	11.1	0.905	-9.41	104	9.43	7.71	16.5	24.6	23.2
2	13.1	0.389	-1.00	-1.90	-3.15	1.37	-1.07	-9.82	77.0	8.91	1.98	-0.986	3.20	9.51
3	-0.167	-3.27	0.970	-4.11	-2.01	0.139	-3.58	-0.149	60.8	14.4	-0.126	-4.80	-5.57	-1.41
4	-7.17	-0.220	0.908	-1.58	-2.92	-0.287	2.34	2.10	47.9	17.4	-3.10	-5.70	-5.49	-1.25
5	-6.76	-0.228	-0.0805	0.528	2.61	-2.17	-3.47	5.32	36.0	32.9	-3.39	-4.29	-7.55	-3.91
6	-12.8	0.527	-1.90	2.86	2.23	2.79	2.39	13.3	17.8	53.8	-4.54	-3.59	-9.76	-6.70

図 71 Quantification タブ画面上で RFU スプレッドシート

■Data Analysis ウィンドウ

Melt Curve(融解曲線)タブ

DNA 結合する蛍光標識試薬および非結合ハイブリダイゼーションプローブに関しては、DNA が二本鎖となるアニーリング時に最も強い蛍光発色が得られます。このため、融解温度(Tm)に向けて温度が上昇すると、蛍光強度は一定の程度で減少します(一定した傾き)。この Tm 条件下では、蛍光強度が大幅に低下するため、傾きが大幅に変化します。こうした傾きの変動程度は、マイナスの導関数グラフに蛍光強度と温度(-d(RFU)/dT)をプロットすることによって求めることができます。蛍光強度の最大変化はグラフ上でピークとして可視され、二重鎖 DNA 複合体の Tm を表します。

ソフトウェアにより、融解曲線間から収集した蛍光強度(RFU)が温度の相関関係としてプロットされます。融解曲線ピークデータを解析するために、ソフトウェア上で閾値用ラインを上下させることにより、開始温度と終了温度が割り付けられます。ピーク領域の底面ラインは、閾値用ライン位置によって特定されます。ピークが有効となるには、少なくとも閾値用ラインと最大ピーク地点間の距離に適合する高さになければなりません。

Melt Curve タブ画面を開くと(図 72)、増幅 PCR 産物の融解温度(Tm)を測定することができます。この画面には、以下の 4 種類の融解曲線データが表示されます。

- **Melt Curve(融解曲線)**:各ウェルの温度毎の蛍光強度(相対値)(RFU)として各蛍光色素のリアルタイムデータが表示されます。
- **Melt Peak(融解曲線ピーク)**:各サンプルの温度毎に RFU のピークを示したマイナスの導関数グラフが表示されます。融解閾値を補正するには、閾値表示用の水平バーをクリック&ドラッグして上限に移動させます。
- **Well Selector(ウェルセレクター)**:選択ウェルを選択して、データの表示・非表示が可能です。
- **Peak spreadsheet(ピークスプレッドシート)**:選択ウェルで収集されたデータがスプレッドシート表示されます。
  注意:スプレッドシートには、各トレース線のピークが 2 カ所まで表示されます。さらにピークデータを表示したい場合は、**Melt Curve Data** タブをクリックしてください。

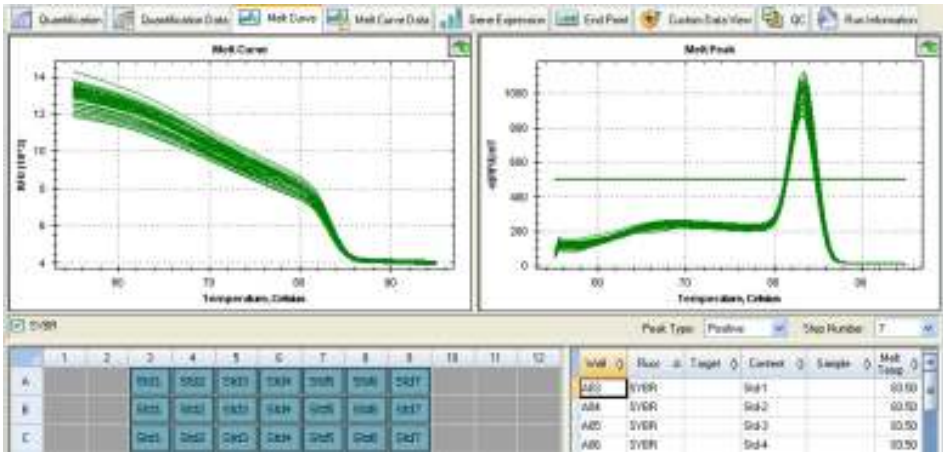


図 72 Data Analysis ウインドウでの Melt Curve タブのレイアウト

以下の方法によって、融解曲線データを調整することが可能です。

- Melt Peak グラフの閾値用ラインを上下にクリック&ドラッグして、データ解析にピーク値を追加または削除します。
- プルダウンメニュー内の **Positive** 項目を選択すると、閾値ラインを上回るピークがスプレッドシートデータに表示されます。**Negative** 項目を選択すると、閾値ラインを下回るピークが同シートデータに表示されます。
- Trace Styles ウインドウを開き、Melt Curve および Melt Peak グラフでのトレース色を変更できます。
- Step Number セレクターの数字を選択すると(83 ページ)、プロトコール内の別ステップでの Melt Curve データを表示できます。プロトコール内で融解曲線にプレートリード(カメラアイコン)が 2 個以上示されている場合は、1 ステップ以上のデータが表示されます。
- ウェルセレクター内でウェルを選択することにより、データのサブセットにまとめます。
- ウェルグループを選択し(83 ページ)、プレート内のウェルのサブセットを表示・解析できます。また、ツールバーの Well Group ドロップダウンメニューでは、名称ごとにウェルグループを選択することができます。

Melt Curve Data(融解曲線データ)タブ

Melt Curve Data タブ画面では、Melt Curve タブに示されたデータが複数のスプレッドシートで表示されます。このデータには各トレースの融解曲線ピークが含まれます。融解曲線データを表示するには、以下の 4 タイプの表データのうち 1 つ選択してください。

- **Melt Peaks(融解曲線ピーク):**各トレースの融解曲線ピークをすべて含むデータを表示。
- **Plate(プレート):**プレート内の各ウェルのデータおよび内容情報を表示。
- **RFU:**各ウェルの各温度条件での RFU 量の表示。
- **-d(RFU)/dT:**温度(T)変化としてマイナスの RFU 変動度合を表示。これはプレート内での各ウェルに対する第一回帰グラフとなります。

Melt Peaks(融解曲線ピーク)スプレッドシート

Melt Peaks スプレッドシートを選択すると(図 73)、融解曲線ピークのデータ表が表示されます。

図 73 Melt Peaks タブ画面での融解曲線ピークスプレッドシート

Melt Peak スプレッドシート(図 73)に示される情報を、表 28 に示します。

表 28 Melt Peaks スプレッドシート情報項目

情報項目	内容
Well	プレートのウェル位置
Fluor	検出された蛍光色素
Content	Plate Editor ウインドウに取り込まれたサンプルタイプ
Target	増幅 DNA(遺伝子)
Sample	Plate Editor ウインドウに取り込まれたサンプルタイプ名称
Melt Temperature	各 PCR 産物の融解温度。スプレッドシートの各列に 1 つのピーク(最高値)を表示。
Peak Height	融解曲線ピークの高さ
Begin Temperature	ピーク開始時の温度
End Temperature	ピーク終了時の温度

Plate スプレッドシート

Plate スプレッドシートを選択すると(図 74)、プレートフォーマットでの融解曲線に関するデータが表示されます。

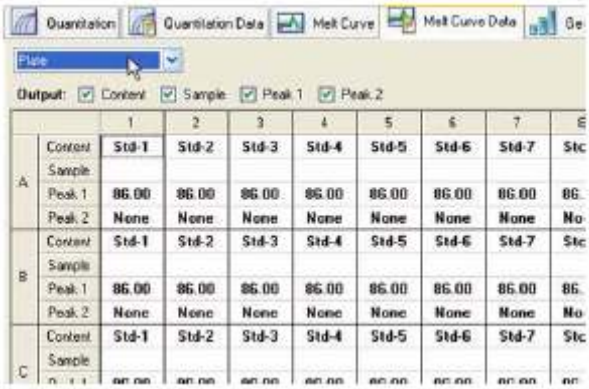


図 74 Melt Curve タブ画面での Plate スプレッドシート

注意:ソフトウェア呼び出しのピークデータを補正するには、Melt Curve タブ画面から、Melt Peak グラフ内の閾値ライン位置を調節してください。

プレートスプレッドシートでは、表 29 に示すとおり、プレート内で選択した蛍光色素の情報が提供されます。

表 29 プレートスプレッドシート情報項目

情報項目	内容
Content	サンプルタイプ(必須入力項目)とリプリケート番号(オプション)の組み合わせ
Sample	サンプルの詳細
Peak 1	第一融解曲線ピーク(最高レベルにある)
Peak 2	第二融解曲線ピーク(より低い)

RFU スプレッドシート

RFU スプレッドシートを選択すると、融解曲線から得られたサイクル毎で各ウェルの蛍光データが表示されます(図 75)。

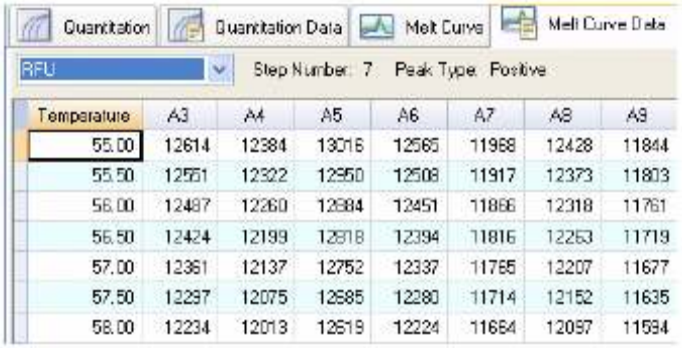


図 75 Melt Curve Data タブ画面での RFU のスプレッドシート

■Data Analysis ウィンドウ

表 30 に、RFU スプレッドシートに含まれる情報内容をまとめます。

表 30 RFU スプレッドシートの情報項目

情報項目	内容
Well number (A1、A2、A3、A4、A5…)	設定されたウェルのプレート内での位置
Temperature	ターゲット増幅 DNA の融解温度。各列に 1 つのウェルとして表示。同一のウェルに複数の産物に対しては複数ウェルとして表示。

-d(RFU)/dT スプレッドシート

-d(RFU)/dT スプレッドシートを選択すると、図 76 に示す表データが表示されます。

Temperature	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
55.00	-136.61	-147.94	-176.25	-225.93	-162.81	-164.52	-178.5
55.48	-92.13	-100.63	-117.33	-155.99	-107.09	-108.02	-116.5
55.99	-47.65	-53.32	-58.41	-85.94	-51.36	-51.52	-54.5
56.48	-3.17	-6.01	0.51	-15.94	4.36	4.98	7.5
57.01	18.47	18.70	25.70	11.10	22.06	25.60	26.0
57.51	57.58	40.24	41.24	31.23	35.80	45.79	41.2
58.00	76.55	47.30	44.09	40.80	46.76	57.15	52.7

図 76 Melt Curve Data タブ画面での-d(RFU)/dT スプレッドシート

表 31 に、-d(RFU)/dT スプレッドシートに表示される情報内容をまとめます。

表 31 -d(RFU)/dT スプレッドシート情報内容

情報項目	内容
Well number (A1、A2、A3、A4、A5…)	設定されたウェルのプレート内での位置
-d(RFU)/dT	温度(T)変化に対するマイナスの RFU 変動度合い

End Point(エンドポイント)タブ

End Point タブ画面を開くと、サンプルウェルの最終サイクルでの RFU (蛍光強度相対値)を解析します。ソフトウェアでは、不明サンプルウェルと陰性対照ウェルの RFU が比較され、不明サンプルウェルを陽性または陰性として判定されます。陽性のサンプルの RFU 値は、陰性対照 RFU 平均値＋カットオフ値に比べて高くなります。

エンドポイントデータを解析するには、必ずプレートに陰性対照を含めてください。陰性対照が含まれなければソフトウェアによってデータが判定されません。その後、以下のプロトコールうちいずれかのタイプでランを行います。

- **Run a Quantification プロトコール:** 通常のプロトコールをセットアップします。PCR 実験のランが終了した後、Data Analysis ウインドウを開いて、Quantification タブ画面にてデータ解析設定を調整します。さらに End Point タブをクリックし、エンドポイントサイクルを選択します。
- **Run an End Point Only プロトコール:** Run Setup ウインドウのプレートタブ画面で End Point Only プロトコールを設定後、プレートを選択・作成して、ランを実行します。

End Point タブ画面では、最終（エンド）サイクルでターゲット遺伝子が増幅されたかどうかを評価する平均 RFU （蛍光強度）が表示されます。こうしたデータを使用し、サンプルに特異的なターゲット配列が含まれているか（陽性であるか）どうかを判定します。陽性の場合には、RFU がカットオフ値よりも高くなります。

アドバイス：エンドポイントプロトコールを作成するには、Protocol タブ（Run Setup ウインドウ）を開き、**Options > End Point Only Run** の順に開いてください。

以下に示すタブレイアウトに、以下のデータが表示されます。

- **Setting（設定）：**データ解析設定を調整します。
- **Results（結果）：**設定調整後には、すぐに結果データが表示されます。
- **Well Selector（ウェルセレクター）：**表示したいエンドポイントデータを含むウェルを選択する。
- **Well spreadsheet（ウェルスプレッドシート）：**選択ウェルで収集された RFU の表データが表示されます。

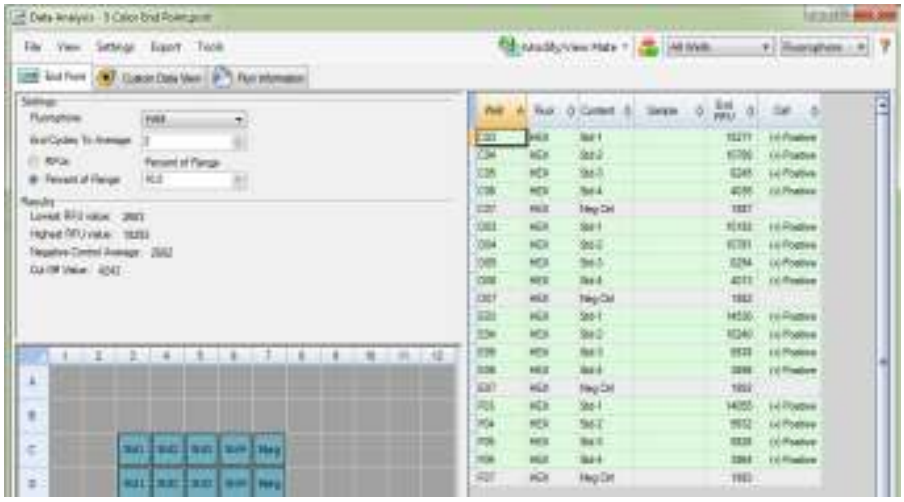


図 77　エンドポイント解析タブの表示レイアウト

結果表には、次の情報が表示されます。

- **Lowest RFU value（RFU 最低値）：**データ内での RFU 最低値を示します。
- **Highest RFU value （RFU 最高値）：**データ内での RFU 最高値を示します。
- **Negative Control Average（陰性対照平均）：**陰性対照を含むウェルの RFU 平均値。
- **Cut Off Value（カットオフ値）：**許容値（RFU または設定に示される範囲率）と陰性対照平均値を加えて算定されます。カットオフ値を上回る RFU にあるサンプルは「陽性」と判定されます。このカットオフ値を補正するには、RFU または範囲率を変更してください。

カットオフ値の計算式は以下のとおりです。

カットオフ値＝陰性対照平均値（Negative Control Average）＋許容値（Tolerance）

許容値のパターンについては、以下のいずれかの方法から選択してください。

- **RFU（初期設定）：**RFU 絶対値を許容値に使用する場合は、この方法を選びます。最大 RFU 許容値は 2 です。その最大値は、最大 RFU 許容値の絶対値−最小 RFU 許容値の絶対値となります。RFU 許容値の初期設定範囲は RFU 全体範囲の 10%となります。
- **Percent of Range（範囲率）：**RFU 許容値範囲率を使用する場合はこの方法を選びます。最小範囲率は 1%、最大範囲率は 99%です。初期設定値は 10%となります。

エンドポイントデータ解析での調整

以下の各方法により、End Point タブ画面に表示される情報を調整・変更してください。

- データ表示するためプルダウンメニューから **Fluorophore** を選択します。
- **End Cycle to Average** 値を選択して、平均サイクル数を設定します。これによりエンドポイント RFU 平均値が自動算定されます。
- **RFUs** を選ぶと、蛍光強度データが表示されます。
- **Percentage of Range** を選ぶと、RFU 範囲率としてデータ表示されます。
- ウェルセレクター内でウェルを選択することにより、データのサブセットにまとめます。
- ウェルグループを選択することにより(83 ページ)、プレート内にあるウェルのサブセットを表示し、データ解析を行うことができます。ツールバーの Well Group ドロップダウンメニューでは、名称ごとにウェルグループを選択することができます。

エンドポイント解析用のデータ項目

表 32 に、End Point タブ画面のスプレッドシートに表示される情報項目をまとめます。

表 32 End Point スプレッドシート情報内容

情報項目	内容
Well	プレート内でのウェル位置
Fluor	検出された蛍光色素
Content	サンプルタイプとリプリケート番号の組み合わせ
End RFU	エンドポイントサイクルでの RFU
Call	陽性または陰性の判定。サンプルが陽性である場合は、その RFU 値が陰性対照の RFU 平均値＋カットオフ値を上回る。
Sample	Plate Editor で設定されたサンプル名称

Allelic Discrimination(対立遺伝子識別)タブ

Allelic Discrimination タブ画面では、陽性対照サンプルの RFU または Cq により、不明サンプルに対してサンプルの遺伝子型が割り付けられます。このデータを使用して、Allele 1、Allele 2、Heterozygote、Unknown、Control 1 または Control 2 の遺伝子型を有するサンプルを特定します。

注意:対立遺伝子識別用データは、複数の蛍光色素を用いたマルチプレックス実験から得る必要があります。各蛍光色素に、全サンプル内で対立遺伝子が 1 つ特定されます。

対立遺伝子識別解析には、少なくとも以下に示すウェル内容情報が必要となります。

- 各ウェルに 2 タイプの蛍光色素 。陽性対照に蛍光色素が 1 種のみ添加されているウェルは除きます。
- 1 タイプの蛍光色素 。ウェルグループのウェル全例に共通するもの。
- NTC(テンプレートなし対照)サンプル。データ正規化を行う場合。

このタブ画面では、以下の対立遺伝子識別データが表示さます。

- **RFU または Cq グラフ:**リアルタイム PCR データ が Allele 1/Allele 2 の RFU または閾値 Cq グラフで表示されます。グラフ内の各ポイントは、1 つのウェル内で単一の蛍光色素から得られたデータを示します。
- **Well spreadsheet(ウェルスプレッドシート):**プレートの各ウェルで収集された対立遺伝子識別データがスプレッドシートで表示されます。
- **Well selector(ウェルセレクター):**表示したいエンドポイントデータが得られているウェルを選択します。

- **Well spreadsheet（ウェルスプレッドシート）:** 選択したウェル内で収集された対立遺伝子識別データがスプレッドシートで表示されます。

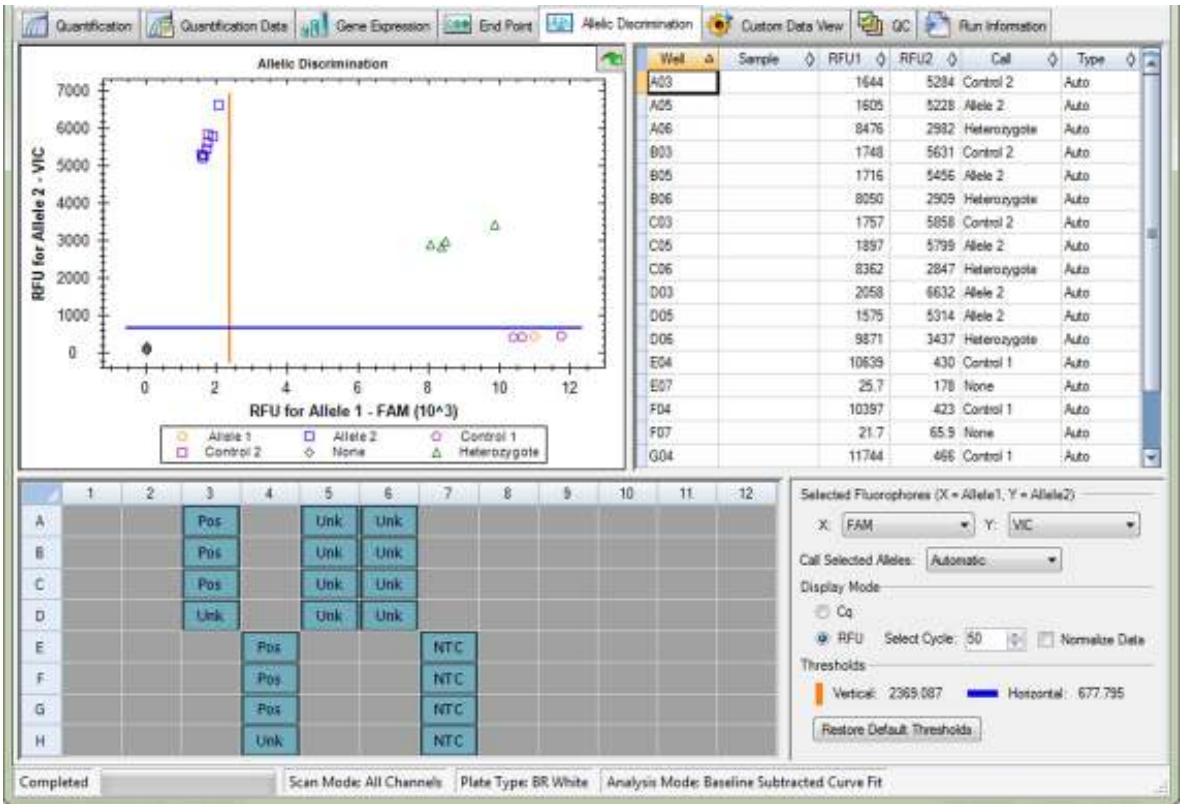


図 78 Data Analysis ウインドウでの Allelic Discrmination タブ画面のレイアウト

対立遺伝子識別データの調整

ソフトウェアでは、垂直および水平の閾値バーの位置に基づいて、不明サンプルのウェルに遺伝子型が自動的に指定されます。その後、スプレッドシートに判定された遺伝子型リストが表示されます。遺伝子型を自動指定するために、ソフトウェアでは陽性対照データが適用されるか（利用可能な場合）、あるいは閾値が推定されます。また、陽性対照の Cq または RFU 平均値が自動計算され、対立遺伝子を識別するための閾値ラインが設定されます。

閾値バーをクリック&ドラッグすることによってその位置を補正します。これによって、ソフトウェアの自動計算によって新たな遺伝子型が割り付けられます。

- プレートに 3 つの対照サンプルが含まれている場合は、対照の RFU または Cq の平均および標準偏差に基づいて閾値バーの位置が定められます。
- プレートに対照サンプルが 2 つ以下にある場合は、選択した蛍光色素での RFU または定量サイクル値の範囲によって閾値バーの位置が定められます。

以下の各方法により、対立遺伝子識別データを調整してください。

- 対立遺伝子識別グラフの本体ラインを示す閾値バーをクリック&ドラッグして、スプレッドシートの判定データを補正します。
- ウインドウ右下の設定選択項目にて、グラフの座標軸（**x** 軸および **y** 軸）に対応する

蛍光色素を選択します。

- 手動により判定データを変更するには、スプレッドシートの列を強調表示した後、判定選択対立遺伝子リスト（Allele 1（対立遺伝子 1）、Allele 2（対立遺伝子 2）、Heterozygote（ヘテロ接合体）、None（なし）、Unknown（不明）、Control 1（対照 1）または Control 2（対照 2））から項目を選択してください。
- **Restore Default Thresholds** ボタンをクリックすると、本体ラインを示す垂直および水平バーが当初の位置に戻り、各バーの横側に数字が表示されます。
- **Cq Display Mode** を選択すると、閾値レベルでデータが表示されます。**RFU Display Mode** モードを選ぶと、選択したサイクルでの蛍光強度データが表示されます。
- **Normalize Data** を選択すると、グラフおよびスプレッドシートに表示された RFU データを正規化することができます。

データの正規化により、x 軸および y 軸の 0～1 の範囲にグラフデータが変動します。RFU データを正規化するためには、Allele 1 および Allele 2 の「テンプレート無し対照」（NCT）サンプルタイプを添加したウェルをプレートに含めてください。こうしたプロットの場合では、Allele 1 および Allele 2 特異的 RFU の線形組み合わせとして RFU データが NCT 値に正規化されます。このプロットは、RFU データを示す効率的な方法となります。

正規化 RFU の計算式は、Livak ら（1995 年）が報告している次式となります。

$$\text{正規化 } A_1 = \frac{A_1}{A_1 + A_2 + x(NTC_{A1+A2})}$$

ここで、

- A_1＝Allele 1 の RFU
- A_2＝Alllele 2 の RFU
- X（上部にマイナス記号）＝平均 RFU
- NTC_{A1+A2}＝Allele 1 および Allelel 2 の NTC サンプルの総和

Allelic Discrimination タブ画面のスプレッドシート

表 33 に、Allelic Discrimination タブ画面の右上に表示されるスプレッドシートに示される情報項目をまとめます。

表 33 Allelic Discrimination スプレッドシートの情報内容

情報項目	内容
Well	プレート内でのウェル位置
RFU1 または Cq1	Allele(対立遺伝子)1 の RFU または Cq
RFU2 または Cq2	Allele(対立遺伝子)2 の RFU または Cq
Call	対立遺伝子の判定。対立遺伝子として、アレル(対立遺伝子)1、アレル(対立遺伝子)2、ヘテロ接合体、不明遺伝子、対照 1 または対照 2 がある。
Type	Auto または Manual。判定方法についての説明。Auto とは、ソフトウェアによって選択されたコール。Manual とは、ユーザーによって選択されたコールを意味する。

Custom Data View タブ

Custom Data View タブはカスタマイズできるフォーマットで複数のペインを同時に表示します(図 79)。

Load a Preset View ドロップダウンリストから表示させるフォーマットのテンプレートの選択ができます。デフォルトで表示されるビューは解析されるファイルに依存します。例えば、融解曲線データがある場合、Amp+Melt 初期設定ビューが表示されます。

データビューは以下のようなカスタマイズが可能です。:

- ドロップダウンリストから代替のプリセットビューを選択する。
- 個々のペインの上にあるドロップダウンメニューを使用する。
- Rows と Columns ドロップダウンの選択オプションを使用する。
- 各ペインの外周のバーをクリック&ドラッグすることでペインの寸法を変更する。

カスタマイズしたビューは **Save as Preset** をクリックすることで新しいプリセットのテンプレートとして保存できます。既存のプリセットは **Manage Presets** を使って削除、名称変更、またはデフォルトのプリセットビューに戻すことができます。

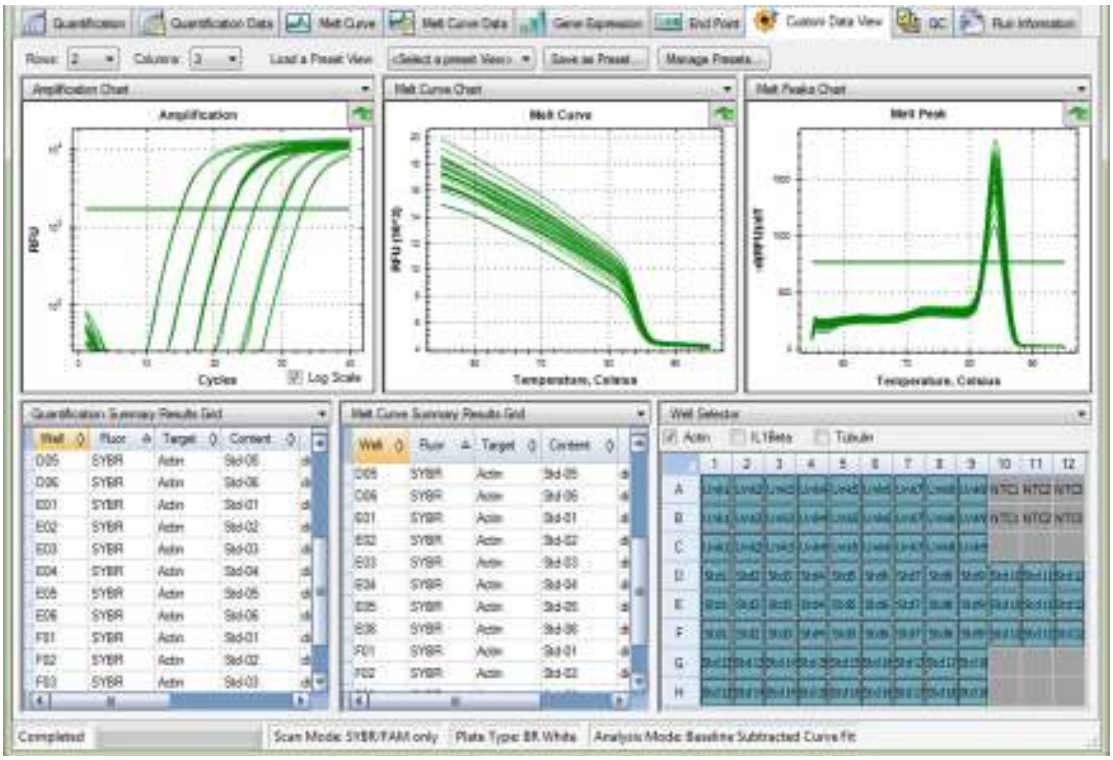


図 79 Custom Data View タブ

QC タブ

QC タブを開くと、User Preferences ウインドウでの QC タブ画面の QC 規定に基づいたランの質を速やかに評価できます(155 ページの「QC タブ」を参照)。

次のレイアウトで QC 情報が表示されます(図 80)。

- **Amplification グラフ:** サイクル毎での各ウェルの RFU を表示します。グラフの各トレース線は、1 個のウェルで単一の蛍光色素から得られたデータを示します。
- **QC rules 表:** 現時点で適用している QC 規定および各設定の内容が表示されます。適用の QC 規定はチェックマークで示されます。QC 規定は Use ボックスをチェックはずすことで取り除けます。
- **ウェルセレクター:** 表示したい蛍光データが得られているウェルを選択します。
- **QC Rule サマリー:** 選択した QC 規定を表示し、規定が満たされないウェルを強調表示する。

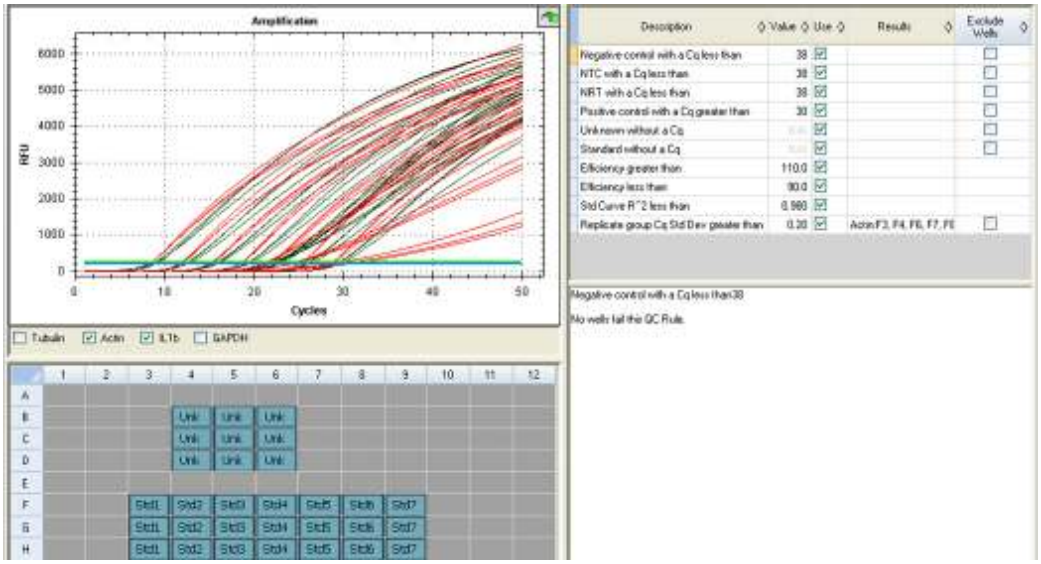


図 80 QC タブのレイアウト

QC 不合格のウェルの排除

QC 規格に不合格のウェルは QC rules 表の結果列とサマリーペインにリスト化されます。これらのウェルは該当の Exclude Wells チェックボックスを付ける、またはチェックをはずすことで解析に加える、もしくははずすことができます。

Run Information(ラン情報)タブ

Run Information タブ画面(図 81)には、各ランに関するプロトコールやその他の情報が表示されます。この画面では以下の項目に関する情報が得られます。

- プロトコールが表示されます。
- メモ入力、その変更ができます。メモ欄に実験やランに関するメモ事項を入力・変更することが可能です。
- ID 入力欄にラン用の ID を入力・変更できます。
- **Other** セクションを表示すると、ラン実行時に発生する可能性があるエラーメッセージなどのイベントを確認できます。こうしたメッセージの表示は、トラブルシューティング時に有用となります。
  アドバイス:プロトコールデータ上を右クリックすると、コピー、データ出力、印刷などが可能となります。また、メモ、ID または他のペインを右クリックすると、テキストの取り消し、カット、コピー、ペースト、削除または選択等を行うことができます。

■Data Analysis ウィンドウ

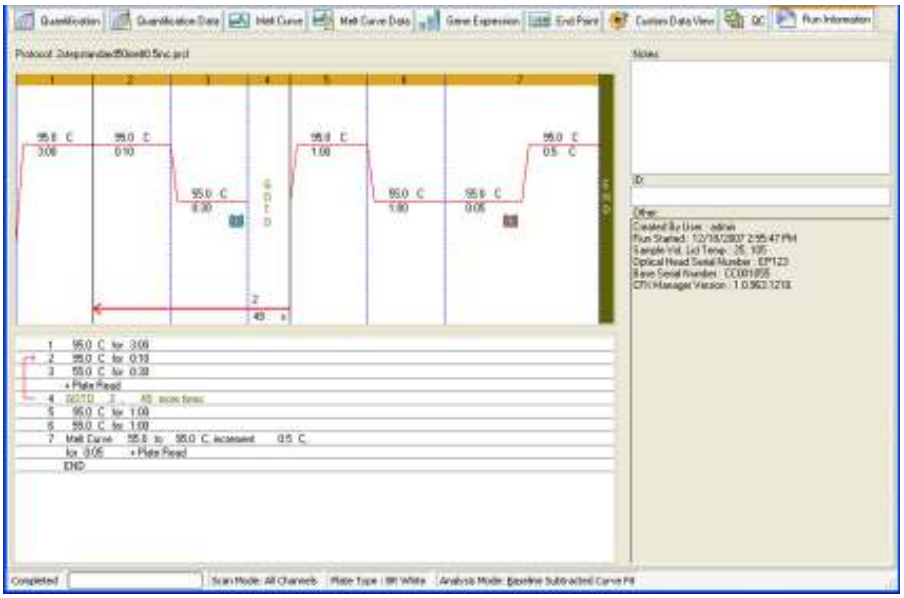


図 81　Run Information タブ画面のレイアウト

データファイル用レポート

Report ウインドウ（図 82）には、Data Analysis ウインドウにある現時点でのデータファイル情報が表示されます。レポートウインドウを開くには、**Tools ＞ Reports** の順に選択するか、Data Analysis ウインドウのツールバー上の **Reports** ボタンをクリックします。

このレポートウインドウには、以下の項目が表示されます。

- **メニューおよびツールバー：**選択項目から、レポートまたはテンプレートのフォーマット、保存、印刷などを行います。
- **Options リスト（ウインドウの左上）：**項目を選択し、レポート内容を表示します。
- **Options ペイン（ウインドウの左下）：**ここから、選択した項目に関する情報を入力します。
- **Preview ペイン（ウインドウ右側）：**現時点でのレポートがプレビュー表示されます。

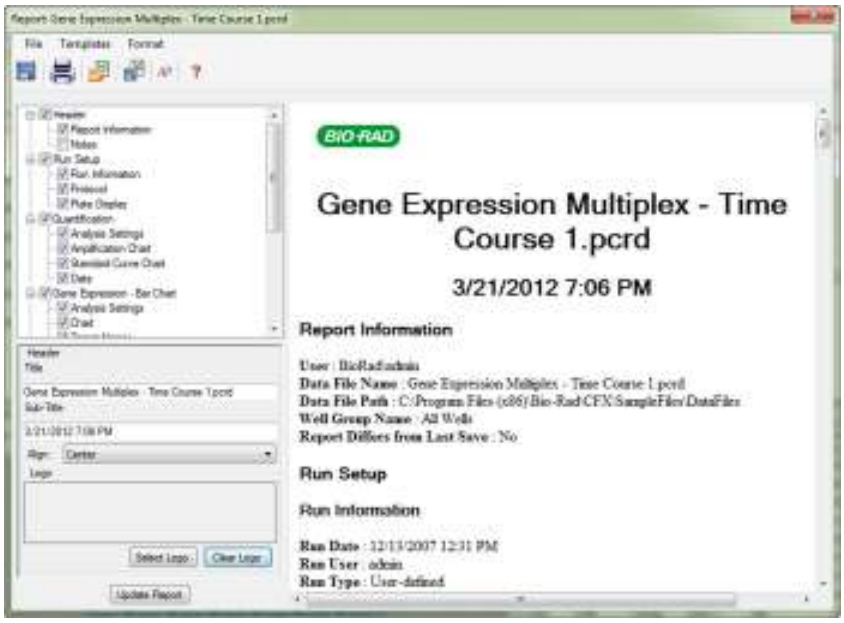


図 82 データファイル用の Report ウインドウの一例

アドバイス:レポートテンプレートとして保存したい場合は、レポートに表示される情報タイプをレイアウト指定できます。**Template > Save** の順に選択するか、**Save As** を選択して、現在のレポートのレイアウトをテンプレートとして保存してください。

データ解析レポートの作成

以下の手順により、Data Analysis ウインドウにてレポートを作成してください。

1. レポート作成前に、Data Analysis ウインドウにてウェル内容、選択した ウェル、グラフおよびスプレッドシートについて最終調整します。
2. Data Analysis メニューバーの **Tools > Report** を選択し、Report ウインドウを開きます。
3. レポートに含めたいオプションを変更します。選択された初期設定項目にあるレポートが表示されます。レポートオプションリストのチェックボックスをクリックすると、全体カテゴリーまたは単一カテゴリー内の個別のオプションを変更できます。
   注意:レポートに表示されるデータは、Data Analysis ウインドウのタブ画面内に現時点で選択されている項目によって決定されます。たとえば、定量ランの場合には検量線が含まれない可能性があります。このため、Data Analysis ウインドウまたはデータレポートにはその曲線データは表示されません。
4. レポート内のカテゴリーやアイテムの並び順は設定したい関連の場所にクリックやドラッグで変更ができます。アイテムはそれらが属するカテゴリー内のみで並び替えできます。
5. **Update Report** ボタンをクリックして一部が変更されたレポートプレビューを更新します。
6. レポートを印刷または保存します。印刷する場合は、ツールバーの **Print Report** ボタンをクリックします。**Fail > Save** の順に選択すると、PDF(Acrobat Reader ファイル形式)、MHT(Microsoft 文書形式)または、MHTML (Microsoft 文書形式)の各形式にフォーマットされたファイルとして保存可能であり、保存場所を選択できます。**Fail > Save As** の順に選択すると、新しい名称のレポートを新しい場所に保存可能です。

7. (オプション)希望する情報を含んだレポートテンプレートが作成可能です。テンプレートに現在のレポート設定を保存するには、**Template > Save As** または **Save As** を選択します。その後は、新規のレポート作成時に保存したテンプレートが画面に読み出されます。

データ解析レポートのカテゴリー

レポートには、表 34 に示すとおり、カテゴリーごとにオプションを含めることが可能です。その場合、Data Analysis ウインドウに表示されるデータタイプによって決定されます。

表 34 オプションリストでの Data Analysis レポートカテゴリー

カテゴリー	選択項目	機能内容
Header		レポートのタイトル、サブタイトルおよびロゴ
	Report Information	実験日、ユーザー名称、データファイル名称、データファイルパス、および選択ウェルグループ
	Audit Informatino	(署名を含む)監査のための補足情報
	Notes	データレポートに関するメモ
Run Setup		
	Run Information	実験日、ユーザー、データファイル名称、データファイルパスおよび選択したウェルグループ
	Protocol	プロトコールステップおよび選択項目をテキスト表示する。
	Plate Display	プレートの各ウェルでの情報をプレートビューで表示する。
Quantification		
	Analysis Settings	データ収集時のステップ番号、解析モード、ベースライン補正法を含む。
	Amplification Chart	定量データを含む実験用に Amplification グラフをコピーする。
	Standard Curve Chart	検量線グラフをコピーする。
	Data	各ウェルでのデータをスプレッドシートで表示する。
Gene Expression - Bar Chart		
	Analysis Settings	解析モード、グラフデータ、スケーリング、グラフエラーバーを選択する。
	Chart	遺伝子発現グラフをコピーする。
	Target Names	名称表を表示する。
	Sample Names	名称表を表示する。
	Data	各ウェルでのデータをスプレッドシートで表示する。
	Target Stability	ターゲット遺伝子の安定性の値のグラフ
Gene Expression - Clustergram, Scatter Plot, Volcano Plot, Heat Map		
	Analysis Settings	各グラフタイプの設定を含む。
	Chart	グラフをコピーする。
	Data	各ターゲットでのデータをスプレッドシートで表示する。
Melt Curve		

表 34 オプションリストでの Data Analysis レポートカテゴリー(続き)

カテゴリー	選択項目	機能内容
	Analysis Settings	融解ステップ番号および閾値ラインを設定する。
	Melt Curve Chart	融解曲線グラフをコピーする。
	Melt Peak Chart	融解曲線ピークをコピーする。
	Data	各ウェルでのデータをスプレッドシートで表示する。
Allelic Discrimination		
	Analysis Settings	表示モード、蛍光色素、サイクル、閾値および正規化データを含む。
	Allelic Discrimination Chart	対立遺伝子識別グラフをコピーする。
	Data	各ウェルでのデータをスプレッドシートで表示する。
End Point		
	Analysis Settings	蛍光色素、最終サイクルの平均、モード、最小 RFU 値、
	Data	各ウェルでのデータをスプレッドシートでっ表示する。
QC Parameters		
	Data	各 QC ルールのパラメータをスプレッドシートで表示する。

Well Group レポート

指定したウェルグループのレポートを作成するには:

1. Data Analysis ウインドウの **Tools > Well Group Reports** を選択します。

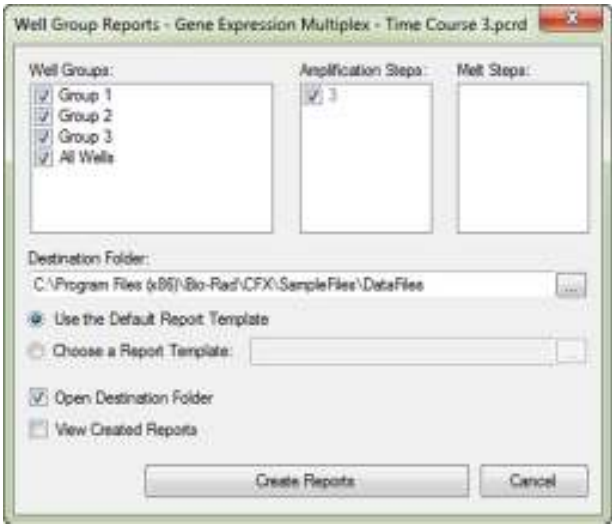


図 83 Well Group Reports ウインドウ

2. **Well Group Reports** ウインドウ（図 78）から、レポートに含める Well Groups、Amplification Steps、Melt Steps を該当するボックスにチェックをつけることで指定できます。
3. Destination Folder（保存先フォルダ）は…ボタンをクリックすることで他の場所に変更することができます。
4. テンプレートを初期設定から他を選びたい場合には **Choose a Report Template** を選択します。…ボタンをクリックして、テンプレートファイルをブラウズします。
5. 該当のボックスをチェックしておくことで、いったんレポートを作成すると、保存先フォルダとレポートが開くことができます。
6. 指定されてレポートを作成するには **Create Reports** をクリックします。

9 第 9 章－遺伝子発現解析

9 遺伝子発現解析

本章では、遺伝子発現解析に関する情報について解説します。

- 遺伝子発現(120 ページ)
- 遺伝子発現解析のプレート設定(121 ページ)
- プレート設定ガイド(122 ページ)
- Bar Chart(棒グラフ) (123 ページ)
- Clustergram(130 ページ)
- Scatter Plot(131 ページ)
- Volcano Plot(132 ページ)
- Heat Map(133 ページ)
- Results(133 ページ)
- Gene Study(134 ページ)
- Gene Study Report ウインドウ(135 ページ)
- データ解析に使用する計算式(139 ページ)

遺伝子発現

PCR 反応で厳密な条件を満たしている対照物質を使用することによって、サンプル間でのターゲット遺伝子濃度の相対差を正規化した遺伝子発現実験を行うことが可能となります。通常、ターゲット遺伝子の発現レベルを正規化するためには、1 種類以上の標準遺伝子の mRNA 量を適用します。こうした標準遺伝子の適用によって、各サンプルに示される取り込み差やその他の変動が考慮されます。

Gene Expression タブを開くと、プレートの 2 ウェル以上の PCR リアクション間の相対差について評価することができます。たとえば、PCR リアクションでのウイルスゲノム相対数またはトランスフェクト配列相対数の評価が可能です。遺伝子発現実験の最も一般的な応用例としては、定常状態の mRNA レベルを推定するために、複数の反応で得られた cDNA 濃度を比較評価します。

ソフトウェア上で以下のシナリオのいずれかにあるターゲット DNA 配列の相対発現レベルが自動的に算定されます。

- 別のターゲット DNA 配列(Target 2)と比較する場合でのターゲット配列(Target 1)の相対発現レベル。たとえば、同一のサンプル処理条件にある遺伝子と比較した場合の遺伝子相対量。

- 異なるサンプル処理条件にある同一ターゲット DNA 配列と比較する場合での、1 サンプル内での 1 ターゲット配列の相対発現レベル。たとえば、異なる時間、グラフまたは発現条件の同一遺伝子と比較した場合の遺伝子相対量。

遺伝子発現解析でのプレート設定

遺伝子発現を解析するため、必ず、プレート内のウェルに以下の情報を設定してください。

- **複数のターゲット DNA 配列:** 2 タイプのターゲット DNA 配列は、サンプル内で増幅遺伝子や増幅配列が異なります。
- **1 タイプ以上のリファレンスターゲット DNA 配列:** 1 タイプ以上のターゲット DNA 配列は、正規化発現解析用のリファレンスターゲット DNA 配列としてください。Experiment Settings ウインドウ(59 ページ)にてリファレンスターゲット DNA 配列をすべて割り付けた後、Normalized Expression モード(Δ Δ Cq)でデータ解析します。なお、実験にリファレンスターゲット DNA 配列を含めない場合は、Relative Expression モード(Δ Cq)で解析してください。
- **共通サンプル:** Gene Expression タブ画面にプロットされたデータを表示するために、必ず、PCR リアクションでのターゲット DNA 配列全例に共通となるサンプル(少なくとも 2 タイプ以上)を含めてください。こうしたサンプルは、各ターゲット DNA 配列配列の処理または条件が異なります。Experiment Settings ウインドウ(59 ページ)にて対照サンプルを割り付けてください。

プレートタブでの遺伝子発現データ設定の要件に関しては、リアクション内容物が、1 タイプの蛍光色素を用いる **singleplex PCR** であるか、または 2 タイプ以上の蛍光色素を用いる **multiplex PCR** であるかによって異なります。

図 84 に、singleplex 遺伝子発現実験で最小限必要なウェル関する内容情報の例を示します。

Unk	Unk
Target1 Sample1	Target1 Sample2
Unk	**Unk**
Target2 Sample1	Target2 Sample2

図 84 singleplex 遺伝子発現実験に用いるウェル内容情報の例

図 85 に、multiplex 遺伝子発現実験で最小限必要なウェル内容情報を示します。

Unk	Unk
Target1 Target2 Sample1	Target1 Target2 Sample2

図 85 multiplex 遺伝子発現実験に用いるウェル内容情報の例

プレート設定ガイド

データファイルのプレート設定が解析に必要な情報を含んでいないで、Gene Expression タブを選択すると、通常棒グラフが表示される部分に情報の入力のための指示が表示されます。正規化遺伝子発現解析のために、以下のステップを完了させてください。:

1. 使用するターゲットとサンプルを定義します。
   - Plate Setup: Plate Editor ウインドウが開きます。
   - Replace Plate File: 以前作成したプレートレイアウトファイルを選択します。
   - Replace PrimePCR File: プレートレイアウト情報を適用された PrimePCR ランファイルを選択します。
2. 使用するリファレンスターゲットとコントロールサンプルを選択します。
   - Experiment Settings: 1つ以上のリファレンスターゲットとコントロールサンプルを選択することができる Experiment Settings ウインドウが開きます。

もしプレートレイアウトにすでにターゲットとサンプル情報が含まれていれば、2番目のステップのみが必要で、2番目のステップがオレンジでハイライトされます。正規化遺伝子発現解析を行うにはこのステップを完了しなければなりません。

注意: Clustergram、Scatter Plot、Volcano Plot、Heat Map のデータはそれぞれ必要条件が満たされた時のみに表示されます。

Bar Chart(棒グラフ)

Gene Expression タブ画面には、ターゲット DNA 配列の相対的発現量データが以下の 2 タイプに表示されます。

- **Gene Expression グラフ:** 正規化発現量(Δ ΔCq)または相対発現量(ΔCq)としてリアルタイム PCR データが表示されます。
- **スプレッドシート:** 各ターゲット DNA の遺伝子発現データがスプレッドシートに一覧表示されます。
  アドバイス:グラフまたはスプレッドシート上で右クリックすると、選択項目が示されます。**View/Edit Plate** ボタンをクリックすると Plate Editor が開き、プレートのウェル内容情報を変更することができます。

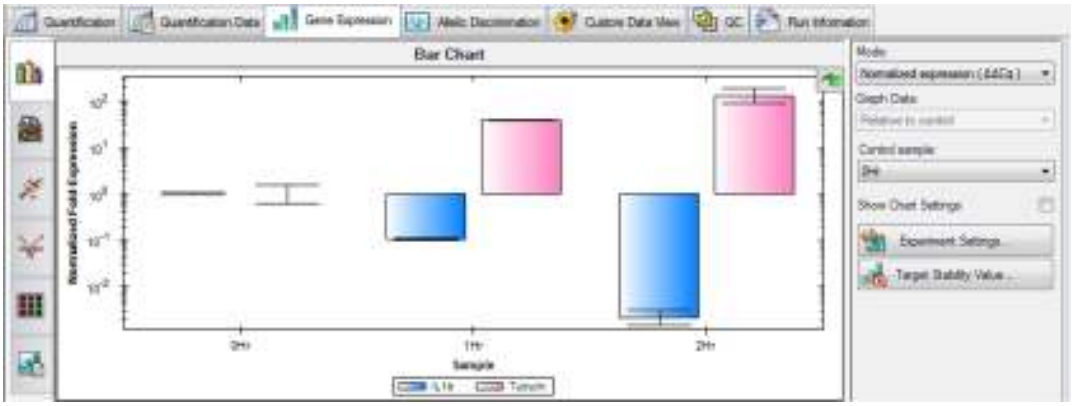


図 86 Data Analysis ウインドウでの Gene Expression タブのレイアウト

アドバイス:グラフ上で右クリックすると、右クリック選択メニューが示されます。メニューから **Sort** を選択すると、グラフのターゲット DNA 配列およびサンプル名称を並び替えできます。
アドバイス: グラフのデータを迅速に設定するために、以下の順に選択します。:1) Mode、2) Control Sample、3) Reference target(s)(Experiment Settings 内)

遺伝子発現データの正規化

データを正規化するためには、正規化因子として 1 つ以上のリファレンス遺伝子(ターゲット遺伝子)の測定発現レベルを使用します。リファレンス遺伝子としては、評価対象となる生物系で調節されていないターゲット分子、たとえばアクチン、GAPDH、ヒストン H3 などが挙げられます。

以下の手順により、正規化遺伝子発現（Δ ΔCq）解析をセットアップしてください。

1. データファイル（.pcrd 拡張子）を開きます。
2. Data Analysis ウインドウの Quantification タブ画面でデータを再チェックします。閾値の補正や解析モード変更等を行ってデータを補正します。
3. **Gene Expression** タブをクリックします。
4. Experiment Settings ウインドウの **Samples** タブ画面で、対照を 1 つ選択します。対照が割り付けられると、1 に設定される対照発現量の相対量が自動的に正規化されます。
5. Experiment Settings ウインドウの Target タブ画面でこの実験用のリファレンス遺伝子を選択します。遺伝子発現の解析時には、サンプル内のターゲット間でリファレンス遺伝子が 1 つ必要となります。
6. 選択していない場合は、**Normalized Expression（Δ ΔCq）**を選択します。その後、Gene Expression タブ画面で発現レベルを確認します。
   注意: **Setup Wizard**（54 ページ）は正規化遺伝子発現解析のためのプレートレイアウトを設定するのに使うことができます。

Relative Quantity（相対量）

定義によって、相対量（ΔCq）データは正規化されません。この解析方法は、リファレンス遺伝子（ターゲット）を含まないサンプルを定量する場合に使用されます。リファレンス遺伝子を用いない場合には、通常、実験設定時において以下に示した点がいずれか考慮されます。

- 各サンプルは、各生物サンプルで同一のテンプレート量を示している。各ウェルでの RNA または cDNA の質量と同一になると考えられる。
- 取り込まれた生物サンプル量でのばらつきは、ソフトウェア解析法以外の方法によって解析された後に正規化される。たとえば、各サンプルに添加される核酸質量、核酸が単離された細胞数などの正規化係数によって相対量を単に除算する方法が選択される可能性がある。

Gene Expression タブのグラフ対照にあるプルダウンメニューから **Relative Quantity（ΔCq）**を選択します。

アドバイス：他の遺伝子発現実験で得られたデータと比較する場合は、新たな Gene Study 画面を開きます（134 ページ）。あるいは、既存の Gene Study にデータファイルを追加します。

遺伝子発現データの調整

データ解析方法の選択が終われば、以下の方法によってグラフ右側の設定項目を変更して、Gene Expression タブに表示されるデータを調整することができます。

GRAPH DATA

- **Relative to control（対照との相対）：**0～1 までの目盛りにある座標軸を示したデータグラフ。実験に対象を適用した場合には、この項目を選択し、ターゲット遺伝子の発現上昇または下降を速やかに可視化します。
- **Relative to zero（ゼロとの相対）：**ゼロ始点によるデータ。

CONTROL SAMPLE

すべてのターゲットの相対量の正規化のサンプルを選択します。

CHART SETTINGS

以下のオプションは **Show Chart Settings** ボックスをチェックすると表示されます。: X-Axis Options、Y-Axis Options, Scaling、Error Type、Chart Error Bar Multiplier

X-AXIS OPTIONS

x 軸選択項目により、遺伝子発現グラフの x 軸に表示される名称を選択できます。

- **Target(ターゲット)**: x 軸にターゲット名称を表示するには、この項目を選択します。
- **Sample(サンプル)**: x 軸にサンプル名称を表示するには、この項目を選択します。

Y-AXIS OPTIONS

y 軸の選択項目により、遺伝子発現グラフを次のいずれかのスケールで表示することが可能です。

- **Linear(線形)**: 線形スケールで表示するには、この項目を選択します。
- **Log 2**: 広範なダイナミックレンジでサンプル評価するには、この項目を選択します。
- **Log 10**: きわめて広範なダイナミックレンジでサンプル評価するには、この項目を選択します。

SCALING OPTIONS

Normalized Gene Expression(ΔΔCq)を選択すると、Gene Expression グラフのスケーリング項目を利用できます。この項目をいずれか一つ選択して、実験デザインによく適合する方法で計算し、データを表示します。

- **Unscaled**: この項目では、非基準化の正規化遺伝子発現が示されます。
- **Highest**: 全サンプルでの最高発現レベルで各サンプルの発現レベルを除算することにより、各ターゲットで最高レベルとなる正規化遺伝子発現がスケール化されます。この選択項目では、最高レベルにスケール化される計算式が適用されます。
- **Lowest**: 全サンプルでの最低発現レベルで各サンプルの発現レベルを除算することにより、各ターゲットで最低レベルとなる正規化遺伝子発現 がスケール化されます。この選択項目では、最低レベルにスケール化される計算式が適用されます。
- **Average**: サンプルのすべての発現レベルの幾何平均により各サンプルの発現量を割ることによって、各ターゲットの平均に正規化された遺伝子の発現をスケール化されます。このスケーリングのオプションは、平均式にスケールを使用しています。

ERROR TYPE

遺伝子発現グラフでの誤差(エラーバー)タイプを以下から選択してください。

- 平均標準誤差(SEM、初期設定となります)
- 標準偏差(Std Dev)

CHART ERROR BAR MULTIPLIER

Gene Expression グラフに表示されるエラーバーの乗数を選択してください。±1(初期設定)、2 または 3 の整数のうちいずれかを選択します。以下の誤差タイプを選択すると、この乗数が変更されます。

- 平均標準誤差として SEM
- 標準偏差として Std Dev

TARGET STABILITY VALUE

1 タイプ以上のリファレンス遺伝子を適用している場合に、このウインドウを開きます。ソフトウェアにより、以下のリファレンス遺伝子の質的なパラメータが計算されます。

- **Coefficient of Variation (CV):** 正規化標準遺伝子の相対量。CV 値が低ければ、安定性が高くなることを示します。
- **M-value:** リファレンス遺伝子発現の安定性の指標。

表 35 発現リファレンス遺伝子の安定性の基準値
(Hellemans et al. 2007)

サンプル	CV	M
Homogeneous	< 0.25	< 0.5
Heterogeneous	< 0.5	< 1

右クリックメニュー項目

表 36 に、Gene Expression グラフ上で使用可能な右クリックメニューの項目を示します。

表 36 右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	グラフをクリップボードにコピーする。
Save as Image	画像ファイルにグラフ表示データを保存する。画像の解像度や大きさを設定して、ファイル形式(PNG、GIF、JPG、TIF、BMP)を選択する。
Page Setup…	印刷用のページ設定を選択する。
Print…	グラフ表示を印刷する。
Set Scale to Default	**Show All** を選択すると、BarChart の枠内に全てのデータを見えるようにする、**Scroll Bar** はグラフ枠に表示するには多いサンプル数だった場合表示される。
Chart Options…	Chart Options ウインドウを開き、グラフ上のスケールを調整する。
Sort	グラフ軸上に表示されるサンプルまたはターゲットの順を並び替える。
User Corrected Std Devs	標準偏差補正式によりエラーバーを計算する。
User Solid Bar Colors	グラフでの実線を表示する。
X-axis labels	X 軸ラベルの表示を水平もしくは斜めを選択する。

データスプレッドシート

表 37 に、Bar Chart のスプレッドシートに表示される情報内容をまとめます。

表 37 Bar Chart タブ画面のスプレッドシートに表示される情報内容

項目	内容
Target	Experiment Settings ウインドウで選択されたターゲット名称(増幅遺伝子)
Sample	Experiment Settings ウインドウで選択されたサンプル名称
Ctrl	Experiment Settings ウインドウで対照としてサンプル名称が選択されている場合、サンプル名称
Expression	選択モードに応じた正規化遺伝子発現(ΔΔCq)または相対量(ΔCq)

表 37 Gene Expression タブ画面のスプレッドシートに表示される情報内容(続き)

項目	内容
Expression SEM(または SD)	選択項目に応じた平均の標準誤差または標準偏差
Corrected Expression SEM (または SD)	選択項目に応じた相対発現量の平均の標準誤差(SEM)または標準偏差(SD)の補正値
Mean Cq	定量サイクルの平均値
Cq SEM(または SD)	定量サイクルの平均の標準誤差または標準偏差

詳細情報の表示

Show Details チェックボックスをチェックすると、表 38 に示す情報が表示されます。

表 38 Show Details 選択による遺伝子発現スプレッドシートに表示される情報

項目	機能内容
Data Set	データファイルでの 1 種類の蛍光色素から得られた蛍光色素データ
Relative Quantity	算定されたサンプル相対量
Relative Quantity SD	算定された相対量の標準偏差
Corrected Relative Quantity SD	補正された相対量の標準偏差
Relative Quantity SEM	算定された相対量の平均の標準誤差
Corrected Relative Quantity SEM	補正された相対量の平均の算定された標準誤差
Unscaled Expression	算定された未測定発現
Unscaled Expression SD	算定された非基準化発現の標準偏差
Corrected Unscaled Expression SD	補正された非基準化発現の標準偏差
Unscaled Expression SEM	算定された非基準化発現の標準誤差
Corrected Unscaled Expression SEM	補正された非基準化発現の標準誤差
Expression	相対発現量
Wells	プレートのウェル番号

Experiment Settings ウインドウ

Bar Chart タブ画面から **Experiment Settings** ボタンをクリックして、Experiment Settings ウインドウを開きます。このウインドウでは、ターゲット DNA およびサンプルの表示・変更、リファレンス遺伝子の選択、対照サンプルの選択、Biological Set Name がウェルに追加されている場合に解析するための Gene Expression Analysis サンプルグループの設定などを行います。(図 87)

図 87 Experiment Settings ウインドウでの Targets タブ選択

これらのタブでリストを調整するには、以下の方法を利用してください。

- 新しいターゲットDNA配列およびサンプル名称を追加するには、**New**ボックスに名称を入力し、さらに **Add** をクリックします。
- リストからターゲット DNA 配列およびサンプル名称を削除するには、その列にある **Remove Name** ボックスをクリックし、さらに **Remove checked item(s)**ボタンをクリックします。
- 遺伝子発現データ解析用に標準サンプルとしてターゲット DNA を選択するには、そのターゲット DNA 名称の横にある **Reference** 列のボックスをクリックします。
- 遺伝子発現データ解析用に対照サンプルとしてサンプルを選択するには、そのサンプル名の横にある **Control** 列のボックスをクリックします。

Biological Set のオプション機能

ウェルへの **Biological Set Names**(生物学的セット名)の割り当てにより、4 パターンのうちの 1 パターンでサンプル解析することが可能です。このオプション機能は、**Experiments Settings** ボタンをクリックし、プルダウンメニューから選択して利用します。

- **Target vs. Sample**:ウェルサンプル名のみ、遺伝子発現データ算定に使用されます。
- **Target vs. Biological Set**:生物学的セット名のみ、遺伝子発現データ算定に使用されます。
- **Target vs. Sample_Biological Set**:サンプル名と生物学的セット名の順で組み合わされ、1 つの名称として算定に使用されます。
- **Target vs. Biological Set_Sample**:生物学的セット名とサンプル名の順で組み合わされ、1 つの名称として算定に使用されます。

Experiment Settings ウインドウでの分析設定の表示

Experiment Settings ウインドウにて **Show Analysis Settings** ボックスをクリックすると、以下のとおり、Gene Expression タブに適用する解析パラメータを表示または変更することができます。

- **Color** 欄の色部分をクリックし、遺伝子発現グラフに表示されるターゲット DNA 配列の色を変更します。
- 各ターゲット DNA 配列の増幅効率に関する数値を入力します。データに検量線が含まれている場合は **Auto Efficiency** を使用することによって増幅効率が自動的に算定されます。別の方法として、以前の測定値を入力します。

図 88 は、**Auto Efficiency** を選択した場合に表示されるターゲット DNA 配列全例の効率データを示します。

図 88 Analysis Settings を選択された状態での Experiment Settings ウインドウの Targets タブ画面

サンプルタブでサンプル設定を修正したい場合は、以下のいずれかの方法をとってください。

- **Color** 列の色表示部をクリックし、遺伝子発現グラフのサンプル表示色を変更します。
- **Show Chart** 列にあるボックスをクリックして、カラー列で選択した色により遺伝子発現グラフ上にサンプルを表示します。

図 89 に、**Show Chart** 機能が選択されたサンプルを表示します。

図 89 Analysis Settings が選択されていて Experiment Settings ウインドウでの Samples タブ画面

Clustergram

Clustergram は異なるターゲット、サンプルでの発現の類似性の度合を元に階層化したデータを示します。
注意:リファレンスターゲットは、棒グラフの相対発現以外のデータプロットのどれでも示すのに選ばれる必要があります。
Clustergram 画像は、以下の通りにサンプルまたはターゲットの相対発現を表します。:

- **アップレギュレーション(赤)**: 高発現
- **ダウンレギュレーション(緑)**: 低発現
- **レギュレーションなし(黒)**
- **算出値なし(黒地に白の×印)**

色の色合いが明るいほど、相対発現の差がより大きいです。もし正規化 Cq 値が算出されていなかったら、四角部分が黒地に白の×印になります。
データプロットの外縁には、クラスタ階層が示されます。類似の発現パタンのターゲットまたはサンプルは隣り合った枝を持つ一方、類似しないパターンはより離れた位置になります。

設定

以下の設定が可能です。:

- **Cluster By**: ターゲット、サンプル、両方もしくは無しを選択できます。
- **Size**: 画像サイズは簡単に明瞭化するためにグラフの拡大率の数字を入れる代わりに、スライダーを使って調整できます。
- **Split Out Replicates**: このオプションはリプリケート個別での値を示します。
  アドバイス: Clustergram、Scatter plot、Volcano plot、Heat Map のカラースキムは各グラフ上での右クリックメニューにあるオプションを選ぶことで、初期設定の Red/Green(赤/緑)から Red/Blue(赤/青)に変更できます。

右クリックメニューオプション

表 39 に Clustergram での右クリックメニュー項目を示します。

表 39 右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	クリップボードにグラフをコピーする。
Save Image As…	グラフを画像ファイルとして保存する。ファイルタイプとしては、PNG、GIF、JPG、TIF、BMP がある。画像の解像度はコンピュータディスプレイと同じになる。
Print…	グラフ表示を印刷する。
Color Scheme	グラフの色を赤/緑または赤/青から選ぶ。

データスプレッドシート

スプレッドシートはターゲット、サンプル、正規化発現をリスト化します。Clustergram から含めるか、除外するかをターゲットに近いチェックボックスをクリックします。右クリックでグラフオプションを選択します。

Scatter Plot

Scatter Plot はコントロール vs 実験サンプルでのターゲットの正規化発現を表します。
Scatter Plot 画像は閾値設定をベースにターゲットの発現について以下のような変化を示します。:

- **アップレギュレーション(赤丸)**: 相対的に高発現
- **ダウンレギュレーション(緑丸)**: 相対的に低発現
- **変化なし(黒丸)**

閾値線をクリック&ドラッグでレギュレーションの閾値を調整します。
アドバイス: Scatter Plot や Volcano Plot に使用するシンボルを変更するには、右クリックメニューから **Symbol** を選んで、現在のオプションから別のものを選択します。

設定

以下の設定が可能です。:

- **Control Sample**
- **Experimental Sample**
- **Regulation Threshold:** この値は変更されると、プロットでの閾値線は適切に移動します。

右クリックメニューオプション

表 40 に Scatter Plot での右クリックメニュー項目を示します。

表 40 右クリックメニュー項目

項目	機能内容
Copy	クリップボードにグラフをコピーする。
Save Image As…	グラフを画像ファイルとして保存する。ファイルタイプとしては、PNG、GIF、JPG、TIF、BMP がある。画像の解像度はコンピュータディスプレイと同じになる。
Page Setup…	印刷のための設定を選択する。
Print…	グラフ表示を印刷する。
Set Scale to Default	拡大した後、初期設定の状態にグラフ表示を戻す。
Chart Options…	グラフを調整するための Chart Options ウインドウを開く。
Symbol	データポイントに使用するシンボルを選択する。
Color Scheme	グラフの色を赤/緑または赤/青から選ぶ。

データスプレッドシート

スプレッドシートはターゲット、サンプル、正規化発現、ターゲットが閾値設定と比較してアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションしているかどうかをリスト化します。プロットから含めるか、除外するかをターゲットに近いチェックボックスをクリックします。右クリックでグラフオプションを選択します。

Volcano Plot

Volcano Plot はコントロール vs 実験サンプルでのターゲットの発現（レギュレーション）の変化と p 値を元にした有意差の程度を表します。
Plot 画像は閾値設定をベースにターゲットの発現について以下のような変化を示します。:

- **アップレギュレーション（赤丸）**:高発現
- **ダウンレギュレーション（緑丸）**:低発現
- **変化なし（黒丸）**

どちらかの垂直の閾値線をクリック&ドラッグでレギュレーションの閾値を調整します。

設定

以下の設定が可能です。:

- **Control Sample**
- **Experimental Sample**
- **Regulation** もしくは **P-Value Threshold:** 値を入力もしくは矢印を使って調節すると、閾値線は適切に移動します。

右クリックメニューオプション

表 40 に Valcano Plot での右クリックメニュー項目を示します。

データスプレッドシート

スプレッドシートはターゲット、サンプル、正規化発現、p 値、閾値を越えた p 値かどうか、ターゲットが閾値設定と比較してアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションしているかどうかをリスト化します。プロットから含めるか、除外するかをターゲットに近いチェックボックスをクリックします。右クリックでグラフオプションを選択します。

Heat Map

Heat Map は相対的正規化発現を元にコントロールサンプルと比較して実験サンプルのターゲットのレギュレーションとプレート上の位置の視覚的描写を提示します。
Heat Map 下の凡例は正規化発現のレンジを示し、以下のように対応します。:

- **アップレギュレーション（赤）**:高発現
- **ダウンレギュレーション（緑）**:低発現
- **変化なし（黒）**

色の色合いが明るいほど、相対発現の差がより大きいです。もし正規化 Cq 値が算出されていなかったら、四角部分が黒地に白の×印になります。

設定

以下の設定が可能です。:

- Control Sample
- Experimental Sample
- Size: 画像サイズは簡単に可視化するためにグラフ拡大を、スライダーを使って調整できます。
- Split Out Replicates: リプリケート毎の値を示します。

右クリックメニューオプション

表 39 に Valcano Plot での右クリックメニュー項目を示します。

データスプレッドシート

スプレッドシートはターゲット、サンプル、レギュレーションをリスト化します。右クリックでグラフオプションを選択します。

Results

Results スプレッドシートは全てのグラフのデータをまとめています。表 41 に Results スプレッドシートの内容がリスト化されています。

表 41 Results タブの情報

情報	機能内容
Target	ターゲット名称（増幅遺伝子）
Sample	サンプル名称
Mean Cq	定量サイクルの平均
Mean Efficiency Corrected Cq	反応効率の調節後の定量サイクルの平均
Normalized Expression	リファレンスターゲットに正規化したターゲット発現（⊿⊿Cq）
Relative Normalized Expression	コントロールサンプルと比較しての正規化発現。Fold Change（倍率変化）とも呼称。
Regulation	コントロールサンプルと比較しての発現の変化。
Compared to Regulation Threshold	閾値設定を元に実験サンプルのアップもしくはダウンレギュレーション
P-Value	発現差が有意である確率
Exceeds P-Value Threshold	閾値を越えたターゲットの P 値であるかどうかを表示

注意: Split Out Replicates が選択されている（例: Clustergram や Heat Map）場合も、リプリケートのデータのみがデータ解析タブのスプレッドシート上に表示されます。棒グラフで Control Sample で”none”を選択されている場合遺伝子発現解析のスプレッドシートの発現データで不一致があるかもしれません。

Gene Study

遺伝子発現ウインドウにて、インターランキャリブレーターを用いて一つ以上のリアルタイム PCR 実験による遺伝子発現データを比較することにより、各実験間で正規化を行うことができます。一つ以上のデータファイル（.pcrd 拡張子）からのデータを Gene Study に加えて Gene Study を作成します。ソフトウェアはそれらのデータをまとめて一つのファイルとします（.mgxd 拡張子）。

注意：Gene Study で解析に必要となる最大サンプル数は、コンピュータの RAM や仮想メモリのサイズによって限定されます。

Gene Study でのインターランキャリブレーション

インターランキャリブレーションは分割されたリアルタイム PCR ラン（異なる.pcrd ファイル）でアッセイされたターゲット間のラン間変動を補正するための各ターゲットでのすべての Gene Study で自動的に適用されます。

プレート間キャリブレーターとしてのサンプルをソフトウェアが認識するためには、ターゲット名、サンプル名（もし使用していれば、生物学的セット名）が比較するすべてのプレートにまたがっていて、合致している必要があります。

注意: 少なくとも一つのインターランキャリブレーターサンプルはインターランキャリブレーションのための Gene Study では必要です。適切なインターランキャリブレーターサンプルなしのターゲットは Gene Study で補正無しで進められることになります（非推奨）。

インターランキャリブレーション実行中、アルゴリズムはインターランキャリブレーターとして与えられるすべてのサンプルのCq値間のpair-wise difference値（ΔCq）を算定するのに使用されます。Gene Study内でのすべてのデータは最も小さい平均のΔCq値を算定するためにインターランキャリブレーターによって補正を行います。Gene Study でのデータファイルにインターランキャリブレーターが1つ以上含まれている場合には、平均ΔCq最小値を伴うキャリブレーターがメインなインターランキャリブレーターとなります。その後、この主要キャリブレーターが適用され、Gene Studyの範囲でCq値がいずれも補正されます。

主要なラン実行時キャリブレーターを特定するため、ソフトウェアではある一定のターゲット（遺伝子）に対するすべてのラン実行時キャリブレーターのΔCq 平均値が自動計算されます。さらに、多層的なアルゴリズム機能により、全データ範囲内でこの主要キャリブレーターが特定されます。このような主要キャリブレーターを特定するアルゴリズムには、以下の段階的機能があります。

1. 特定のペアワイズ比較法において、共通の複製グループが最高数となるターゲットに対して主要キャリブレーターが設定されます。
2. いずれかのターゲットでその共通する複製グループ数が同一である場合には、ペアワイズ比較にて、ΔCq 値の最小範囲にあるターゲットに主要キャリブレーターが設定されます。この範囲については、特定ターゲットのラン実行時キャリブレーターのΔCq最大値とΔCq最小値の間で絶対差を比較することにより評価されます。
3. いずれかのターゲットがそのΔCq 値と同一の範囲にある場合は、基準を満たしたラン実行時キャリブレーターの平均ΔCq 最小絶対値を伴うターゲットに主要キャリブレーターが設定されます。
4. いずれかのターゲットがその平均ΔCq 絶対値と同一である場合には、最小ΔCq にある複製グループに主要キャリブレーターが設定されます。
   注意：Gene Study 機能に入力された初回データファイルが、ラン実行時キャリブレーションのペアワイズ比較での「主軸」ファイルとして適用されます。

Gene Study ウインドウ

Gene Studyウインドウには、次のタブ画面が2つ表示されます。

- **Study Setup タブ：**このタブをクリックすると、Gene Studyファイルの実験項目をセットアップできます。Gene Study ファイルにデータを追加しても、除外してもファイルのオリジナルデータは変更されません。
- **Study Analysis タブ：**このタブをクリックすると、組み合わせ実験での遺伝子発現データが表示されます。

図 90 に、Study Setup および Analysis タブを含む Gene Study ウインドウを示します。

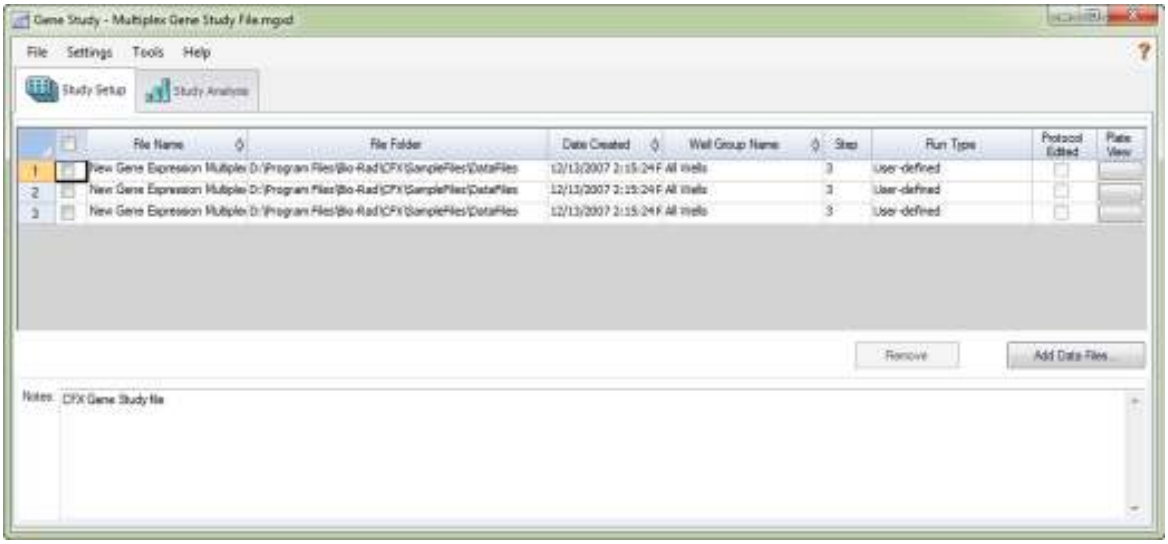


図 90 Gene Study ウインドウでの Study Setup タブ

Study Setup タブ

Gene Study ウインドウにデータを取り込む前に、Data Analysis ウインドウにて以下の作業を必ず行ってください。

- 同じ内容を含むサンプルには同一名称がつけられていることを確認します。ソフトウェアによる Gene Study では、同一のターゲットまたはサンプルが入るウェルには同一サンプルが含まれるものと判定されます。
- Gene Study 機能にデータを追加するまでに、各実験データを最適化するために Quantification タブ画面にてベースラインおよび閾値(Cq)を調整してください。
- Gene Study に含めるウェルグループを選択します。

Study Setup タブ画面には(図 90)、Gene Study で実施された全実験リストが表示されます。

- **ラン追加:Add Data Files** ボタンをクリックし、ブラウザウインドウからファイルを 1 つ選択します。Gene Study 画面に実験を直接追加するには、Gene Study ウインドウにデータファイル(.pcrd 拡張子)をクリック&ドラッグしてください。
  アドバイス:Gene Study 画面にウェルグループからデータを表示するには、データファイルを取り込む前にウェルグループを選択してください。
- **Gene Study からのラン削除:**リストから 1 つまたは複数のファイルを選択し、**Remove** をクリックします。
- **Gene Study に関するメモ追加:**メモボックスに Gene Study ファイルや解析に関するコメントを入力できます。

Study Setup タブ画面には、表 42 のとおり、Gene Study 用のデータファイルが表示されます。

表 42 Gene Study ウインドウでの Study Setup タブのデータ項目

列名称	内容
File Name	実験データファイル (.pcrd 拡張子)の名称。
File Folder	Gene Study での各実験用データファイルを保管するディレクトリ
Date Created	データが収集された期日

表 42 Gene Study ウインドウでの Study Setup タブのデータ項目（続き）

列名称	内容
Well Group Name	Gene Study にファイルを追加した際に選択するウェルグループ名称 アドバイス：Gene Study 画面にウェルグループからデータを表示するには、データファイルを取り込む前にウェルグループを選択してください。
Step	リアルタイム PCR データを収集するためのプレートリードを含むプロトコールステップ
Run Type	ユーザー設定または PrimePCR ランかを表示
Protocol Edited	チェックされていると、PrimePCR ランを編集して使用されたプロトコールであることを示す。
Plate View	Gene Study に含まれるラン毎のデータを含んだプレートマップを開く

Study Analysis タブ

この Study Analysis タブには、Gene Study で追加された実験データ全例が表示されます。このタブ画面からデータを解析し、以下に示す遺伝子発現グラフ諸機能を選択することができます。

- Bar Chart で、インターランキャリブレータ値がもし計算されているのであれば、Inter-run Calibration ボタンをクリックして表示させます。
- Heat Map で、同じターゲットが複数プレートの同じ位置にあり、違うサンプルの場合、解析のために適切なプレートを選択するたにドロップダウンメニューを使用します。

Gene Study Report ウインドウ

Gene Study Report ウインドウにて、レポートに Gene Study データをアレンジします。
以下の手順により、Gene Study レポートを作成してください。

1. レポート作成前に必要に応じて、Gene Study レポートのデータやグラフを調整します。
2. **Tool > Reports** の順に選択し、Gene Study ウインドウを開きます。
3. レポート選択項目リストのチェックボックスをクリックして、選択項目を追加・削除します。表 43 に示したオプション機能を選択します。

表 43 Gene Study レポート用のカテゴリー

カテゴリー	選択項目	機能内容
Header		レポートのタイトル、サブタイトルおよびロゴ
	Report Information	作成日、ユーザー名称、データファイル名称、データファイルパス、および選択ウェルグループ
	Gene Study File List	Gene Study での全データファイルのリスト
	Notes	データレポートに関するメモ
Study Analysis-Bar Chart	Analysis Settings	選択された解析パラメータのリスト
	Chart	データを示す遺伝子発現グラフ

表 43 Gene Study レポート用のカテゴリー(続き)

カテゴリー	選択項目	機能内容
	Target Names	Gene Study でのターゲットのリスト
	Sample Nmaes	Gene Study でのサンプルのリスト
	Date	データを示すスプレッドシート
	Target Stability	ターゲットの安定性データ
	Inter-run Calibration	インターランキャリブレーションデータ
Study Analysis-Clustergram, Scatter Plot, Volcano Plot, Heat Map	Analysis Settings	選択された解析パラメータのリスト
	Chart	データを示す遺伝子発現グラフ
	Data	データを示すスプレッドシート

4. レポート選択ペインでテキストおよび画像を入力し、レポート内容を盛り込みます(図 91)。

図 91 Gene Study レポートのヘッダーおよびロゴオプションの一例

5. **Update Report** ボタンをクリックし、変更したレポートプレビュー表示を更新します。レポートペインにレポートが表示されます。

6. レポートを印刷または保存します。印刷する場合は、ツールバーの **Print** ボタンをクリックします。**File > Save** の順に選択すると、PDF(Acrobat Reader ファイル形式)、MHT(Microsoft 文書形式)または、MHTML(Microsoft 文書形式)の各形式にフォーマットされたファイルとして保存可能であり、保存場所を選択できます。**File> Save As** の順に選択すると、新しい名称のレポートを新しい場所に保存できます。

7. いずれのレポートの場合であっても、希望する情報を含めたレポートを作成した後に、レポートテンプレートを作成します。テンプレートを作成するには、**Template > Save** または **Save As** を選択し、現在のレポートをテンプレートとして保存してください。

データ解析に使用する計算式

CFX Manager ソフトウェアでは、自動的に計算式が算定されてデータ解析タブ画面に結果データが表示されます。

増幅効率

エビデンスによれば、Gene Expression タブ画面で使用される計算式で解析した場合に、各プライマーおよびプローブセットの増幅効率の正確な測定法によって精度の高い結果が得られることがわかっています。Gene Expression タブでの計算に適用される増幅効率の初期設定値は 100%となります。増幅効率を評価するには、関連ダイナミックレンジ間にある代表的サンプルの連続的濃度にある希釈液を用いて検量線を作成したうえで、その後の遺伝子発現データ解析にてその効率を記録します。実験に検量線を用いる場合、Experiment Settings ウインドウの Targets タブで Auto Efficiency 機能で増幅効率をチェックしていれば、ソフトウェアによって増幅効率が計算され、Quantification タブ画面の Standard Curve グラフ下に表示されます。
増幅効率(%)の計算式に適用される効率係数(E)は、Pfaffl(2001)および Vandesompele ら(2002)の論文に記載される"efficiencies"から引用しています。この文献では、効率係数 2(各サイクルの正味倍)が本ソフトウェアの増幅効率 100%と同等であるとしています。以下の数式を適用すれば、ユーザーが利用する増幅効率を本ソフトウェアで適用する計算式に転換することが可能です。

- E＝(%効率 × 0.01) + 1
- %効率＝(E − 1)× 100

相対量

サンプル(GOI)の相対量(ΔCq)は次式により計算します。

$$\text{相対量}_{\text{サンプル(GOI)}} = E_{GOI}^{(C_{T(MIN)} - C_{T(sample)})}$$

ここで、

- E＝プライマーおよびプローブセットの効率係数。この係数は(%効率 × 0.01) + 1 の式で計算されます。この場合、効率 100%＝2。
- $C_{T(MIN)}$＝GOI の平均 Cq 最低値にあるサンプル平均 Cq
- $C_{T(sample)}$＝サンプルの平均 Cq
- GOI＝目的遺伝子(1 ターゲット)

対照を選択した場合の相対量

対照サンプル(対照)を指定している場合は、次式によってターゲット遺伝子を有するサンプル(GOI)の相対量(RQ)が計算されます。

$$\text{相対量}_{\text{サンプル(GOI)}} = E_{GOI}^{(C_{T(control)} - C_{T(sample)})}$$

ここで、

- E＝プライマーおよびプローブセットの効率係数。この係数は(%効率 × 0.01) + 1 の式で計算されます。この場合、効率 100%＝2。
- $C_{T(control)}$＝対照サンプルの平均 Cq

- $C_{T(sample)}$＝GOI を含むサンプルの平均 Cq
- GOI＝目的遺伝子（1 ターゲット）

相対量の標準偏差

相対量の標準偏差は次式により計算されます。

$$SD\ 相対量 = SD\ Cq_{GOI} \times SD\ Cq_{サンプル\ x} \times Ln(E_{GOI})$$

ここで、

- SD 相対量＝相対量の標準偏差
- SD Cqsample＝サンプル（GOI）の Cq の標準偏差
- 相対量＝サンプル相対量
- E＝プライマーおよびプローブセットの効率係数。この係数は（%効率 × 0.01）+ 1 の式で計算されます。この場合、効率 100%＝2。
- GOI＝目的遺伝子（1 ターゲット）

効率校正 Cq（Cq_E）

効率校正 Cq は次式により計算されます。

$$Cq_E = Cq \times (\log(E)/\log(2))$$

ここで、

- E ＝ 効率

平均効率校正 Cq（Mcq_E）

平均効率校正 Cq は次式により計算されます。

$$MCq_E = \frac{Cq_{E\ (Rep\ 1)} + Cq_{E\ (Rep\ 2)} + \ldots + Cq_{E\ (Rep\ n)}}{n}$$

ここで、

- CqE ＝ 効率校正 Cq
- n ＝ リプリケート数

正規化係数

正規化発現の等式の分母は、正規化係数として引用されます。次式に記載されるとおり、この正規化係数は、一定サンプルのリファレンスターゲット（遺伝子）全例の相対量の相乗平均となります。

$$正規化係数_{サンプル(GOI)} = (RQ_{サンプル(Ref1)} \times RQ_{サンプル(Ref2)} \times \ldots \times RQ_{サンプル(Ref\,n)})^{1/n}$$

ここで、

- RQ＝相対量
- n＝標準ターゲット数
- GOI＝目的遺伝子（1 ターゲット）

正規化発現

正規化発現（ΔΔCq）とは、実験に使用する生物系のリファレンスターゲット（遺伝子または配列）量を正規化したターゲット（遺伝子）の相対量に相当します。リファレンスターゲットを選択するためには、Experiment Settings ウインドウを開き、標準遺伝子として使用する各ターゲットの標準列(欄)をクリックします。

正規化発現の計算式は、算定相対量（RQ）の計算式を適用した次の式で表すことができます。

$$\text{正規化発現}_{\text{サンプル(GOI)}} = \frac{RQ_{\text{sample(GOI)}}}{(RQ_{\text{サンプル(Ref1)}} \times RQ_{\text{サンプル(Ref2)}} \times \ldots \times RQ_{\text{サンプル(Ref n)}})^{1/n}}$$

ここで、

- RQ＝サンプルの相対量
- Ref＝1 つまたは複数のリファレンスターゲットを含む実験でのリファレンスターゲット
- GOI＝目的遺伝子（1 ターゲット）

リファレンスターゲットが実験に使用する生物系の発現レベルを変化させないものと仮定した場合、正規化発現レベルを計算することにより、各サンプルに示されるセル数の取り込み差やそのばらつきが明らかとなります。

対照選択時での正規化発現

Experiment Settings ウインドウにて対照サンプルを選択している場合では、対照サンプルの発現レベルが 1 に自動設定されます。この条件にて、対照発現量（1 の値）と比較した場合のターゲット（遺伝子）全例の相対量がソフトウェアにより正規化されます。この正規化発現レベルは、対照が選択されている場合の非基準化発現解析値と同等となります。

注意: これは相対正規化発現（RNE）と倍率変化（Fold Change）として知られています。

正規化発現の標準偏差

正規化発現レベルを再基準化するには、選択した基準化に応じて、最大または最低レベルにある個々の正規化発現レベルによって正規化発現レベルの標準偏差を除算します。この正規化係数の標準偏差（SD）は次式によって計算されます。

$$SD\ NF_n = NF_n \times \sqrt{\left(\frac{SD\ RQ_{\text{sample (Ref 1)}}}{n \times RQ_{\text{sample (Ref 1)}}}\right)^2 + \left(\frac{SD\ RQ_{\text{sample (Ref 2)}}}{n \times RQ_{\text{sample (Ref 2)}}}\right)^2 + \ldots + \left(\frac{SD\ RQ_{\text{sample (Ref n)}}}{n \times RQ_{\text{sample (Ref n)}}}\right)^2}$$

ここで、

- RQ＝サンプルの相対量
- SD＝標準偏差
- NF＝正規化係数
- Ref＝リファレンスターゲット
- n＝リファレンスターゲット数

実験に対照サンプルを指定している場合は、次式に示す標準偏差の再基準化機能を適用する必要はありません。

$$SD\ NE_{サンプル(GOI)} = NE_{サンプル(GOI)} \times \sqrt{\left(\frac{SD\ NF_{sample}}{NF_{sample}}\right)^2 + \left(\frac{SD\ RQ_{sample\ (GOI)}}{RQ_{sample\ (GOI)}}\right)^2}$$

ここで、
- NE =正規化発現
- RQ＝サンプルの相対量
- SD＝標準偏差
- GOI＝目的遺伝子(1 ターゲット)

最高発現レベルで基準化した正規化発現

対照サンプルを実験に適用しない場合には、サンプル全例での最高発現レベルによって各サンプルの発現レベルを除することによって、各ターゲット(遺伝子)の正規化発現(NE)を基準化します。ソフトウェアでは最高発現レベルが 1 に設定され、サンプル全例の発現レベルが再基準化されます。最高発現レベルによる基準化は次式から計算します。

$$基準化した正規化発現_{サンプル(GOI)} = \frac{正規化発現_{サンプル(GOI)}}{正規化発現_{最高サンプル(GOI)}}$$

ここで、GOI＝目的遺伝子(ターゲット)

最低発現レベルで基準化した正規化発現

対照サンプルを実験に適用しない場合には、サンプル全例での最低発現レベルによって各サンプルの発現レベルを除することによって、各ターゲット(遺伝子)の正規化発現(NE)を基準化します。ソフトウェアでは最低発現レベルが 1 に設定され、サンプル全例の発現レベルが再基準化されます。最低発現レベルによる基準化は次式から計算します。

$$基準化した正規化発現_{サンプル(GOI)} = \frac{正規化発現_{サンプル(GOI)}}{正規化発現_{最低サンプル(GOI)}}$$

ここで、GOI＝目的遺伝子(ターゲット)

平均発現レベルで基準化した正規化発現

対照サンプルを実験に適用しない場合には、サンプル全例での相乗平均発現レベルによって各サンプルの発現レベルを除することによって、各ターゲット(遺伝子)の正規化発現(NE)を基準化します。ソフトウェアでは平均発現レベルが 1 に設定され、サンプル全例の発現レベルが再基準化されます。平均発現レベルによる基準化は次式から計算します。

$$基準化した正規化発現_{サンプル(GOI)} = \frac{正規化発現_{サンプル(GOI)}}{正規化発現_{GM(GOI)}}$$

ここで、
- GOI＝目的遺伝子(ターゲット)

- GM＝相乗平均発現レベル

基準化した正規化発現の標準偏差

正規化発現（NE）レベルを再基準化するには、選択した基準化に応じて、最大（MAX）または最低（MIN）の発現レベルにある正規化発現量によって正規化発現レベルの標準偏差（SD）を除します。

注意：対照サンプルを実験に指定している場合は、標準偏差の再基準化機能を適用する必要はありません。

この計算式は以下のとおりです。

$$\text{SD 基準化した NE}_{\text{サンプル(GOI)}} = \frac{\text{SD NE}_{\text{サンプル(GOI)}}}{\text{NE}_{\text{Max または Min(GOI)}}}$$

ここで、

- NE＝正規化発現
- SD＝標準偏差
- GOI＝目的遺伝子（ターゲット）
- MAX＝最高発現レベル
- MIN＝最低発現レベル

レギュレーション

レギュレーションは実験サンプル対コントロールサンプルでのターゲットの発現の増加または減少の値で、以下のように決定します。

$$\text{RNE} \geqq 1,\ \text{レギュレーション} = \text{RNE}$$

$$\text{RNE} < 1,\ \text{レギュレーション} = (-1)/\text{RNE}$$

ここで

- RNE ＝ 相対的正規化発現；これはコントロールを選択した時の正規化発現と同じです。

P 値

P 値はコントロールと比較して実験サンプルのデータポイントの統計的な有意差の値です。

注意: P 値を決定するためはコントロールと実験サンプル両方で、少なくとも2つのリプリケートが必要です。さらに多いリプリケートがあると、精度が高くなります。

P 値は以下のように計算されます。

P 値 ＝ 1 － A

ここで

$$A = \int_{x=-t}^{t} = \frac{\Gamma\left(\frac{v+1}{2}\right)}{\sqrt{v\pi}\,\Gamma\left(\frac{v}{2}\right)}\left(1+\frac{x^2}{v}\right)^{-\frac{v+1}{2}}$$

ここで

$$v = \text{Count}\left(NE_{\text{sample (Experimental)}}\right) + \text{Count}\left(NE_{\text{sample (Control)}}\right) - 2$$

- Γ ＝ ガンマ関数
- t ＝ t 統計量

$$t = \frac{\left|Mean\left(NE_{sample(exp\,t)}\right) - Mean\left(NE_{sample(control)}\right)\right|}{\sqrt{\frac{\left(Count\left(NE_{sample(exp\,t)}\right)-1\right)*SD\left(NE_{sample(exp\,t)}\right)^2 + \left(Count\left(NE_{sample(control)}\right)-1\right)*SD\left(NE_{sample(control)}\right)^2}{Count\left(NE_{sample(exp\,t)}\right)+Count\left(NE_{sample(control)}\right)-2}} * \sqrt{\left(\frac{1}{Count\left(NE_{sample(exp\,t)}\right)} + \frac{1}{Count\left(NE_{sample(control)}\right)}\right)}$$

ここで

- Mean ＝ 算術的平均
- NE ＝ 正規化発現
- Count(x) ＝ リスト x のサイズ
- SD ＝ サンプル標準偏差

補正値の計算式

リアルタイム PCR 実験の一部として検量線を作成した場合では、補正値と非補正値との間の差のみが明らかになります。このソフトウェアでは、誤差拡散を測定するうえで以下の誤差指標が適用されます。

- 標準誤差
- 正規化発現 レベルの標準誤差
- 正規化ターゲット遺伝子（ターゲット）の標準誤差

標準誤差の計算式は次のとおりです。

$$\text{標準誤差} = \frac{\text{SD}}{\sqrt{\text{n}}}$$

ここで、

- n＝リファレンスターゲット（遺伝子） 数
- SD＝標準偏差

正規化発現計算式での正規化係数の標準誤差は、次式で示されます。

$$\text{SE NF}_n = \text{NF}_n \times \sqrt{\left(\frac{\text{SE RQ}_{\text{sample (Ref 1)}}}{\text{n} \times \text{SE RQ}_{\text{sample (Ref 1)}}}\right)^2 + \left(\frac{\text{SE RQ}_{\text{sample (Ref 2)}}}{\text{n} \times \text{SE RQ}_{\text{sample (Ref 2)}}}\right)^2 + \ldots + \left(\frac{\text{SE RQ}_{\text{sample (Ref n)}}}{\text{n} \times \text{SE RQ}_{\text{sample (Ref n)}}}\right)^2}$$

ここで、

- n＝リファレンスターゲット数
- SE＝標準誤差

- NF＝正規化発現
- RQ＝相対量

目的遺伝子（GOI）の正規化発現量の標準誤差の計算式は次のとおりです。

$$SE\ GOI_n = GOI_n \times \sqrt{\left(\frac{SE\ NF_n}{NF_n}\right)^2 + \left(\frac{SE\ GOI}{GOI}\right)^2}$$

ここで、

- SE＝標準誤差
- GOI＝目的遺伝子（1 ターゲット）
- NF＝正規化係数
- n＝リファレンスターゲット数

10 第 10 章－ユーザー基本設定

10　ユーザー基本設定

本章では、以下のソフトウェアでのユーザー基本設定に関して解説します。

- ログインまたはユーザー選択（147 ページ）
- User Preferences ウインドウ（148 ページ）
- ユーザー管理（156 ページ）

ログインまたはユーザー選択

CFX Manager ソフトウェアには、以下に示すソフトウェアユーザー管理やユーザー基本設定の選択などの機能が備わります。
CFX Manager ソフトウェアでは、ログインダイアログボックスからログインしたユーザーが管理されます（図 92）。ユーザーがソフトウェアを起動すると、ユーザー管理ウインドウに 2 名以上のユーザーがいると、ログインダイアログボックスが表示されます。

図 92　ログインダイアログボックス

以下の手順により、ソフトウェアへのログイン、またはユーザー変更を行ってください。

1. ログインダイアログボックスを開いていなければ、ツールバーの **Select User** ボタンをクリックするか、メニューバーの **User > Select User** を選択して、ボックスを開いてください。
2. **User Name** プルダウンリストから名称を 1 つ選択します。初期設定名は、"Admin"（管理者）となります。
3. **Password** ボックスにパスワードを入力します。
4. **OK** をクリックし、ソフトウェアを開きます。その後、ログインダイアログボックスを閉じます。
5. 新規ユーザー名およびパスワードを追加するには、ソフトウェア管理者に確認してください。

パスワードの変更

以下の手順により、パスワードを変更してください。

1. **User > Change Password** の順に選択し、パスワード変更ダイアログボックスを開きます（図 93）。
2. Old Password ボックスに旧パスワードを入力します。
3. New Password ボックスに新しいパスワードを入力し、さらに Confirm Password（パスワード再入力）ボックスにも新しいパスワードを入力します。
4. **OK** をクリックし、変更内容を確定します。

図 93 Change Password ダイアログボックス

User Preferences ウインドウ

CFX Manager ソフトウェアでは、ソフトウェアログインユーザーの基本設定を行うことができます。基本設定を変更する場合には、次のいずれかの方法により、User Preferences ウインドウを開きます。

- メインウインドウツールバーにある **User Preferences** ボタンをクリックします。
- メインウインドウのメニューバーから **Users > User Preferences** の順に選択します。
- 設定を表示・変更するには、タブのひとつをクリックします（図 94）。

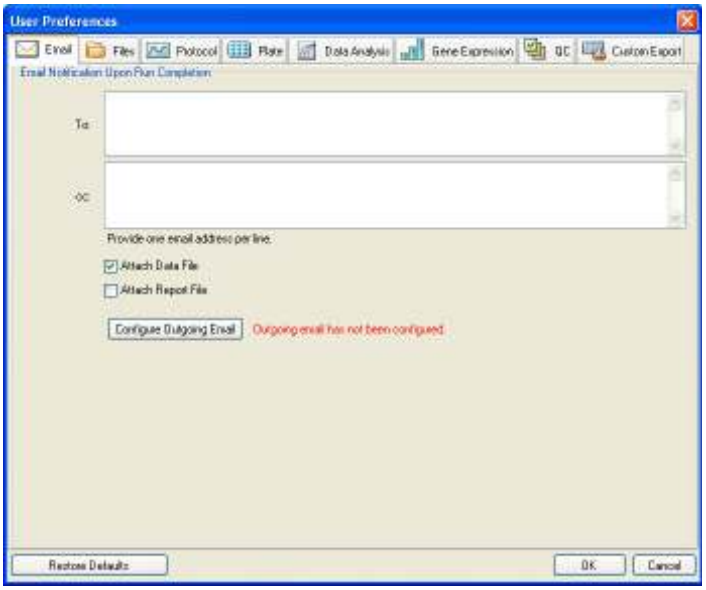


図 94 複数のタブがある User Preferences ウインドウ

アドバイス：**Restore Default** ボタンをクリックすると、この画面に表示される設定がいずれも初期設定に戻ります。その後、**OK** をクリックすると、設定が確定され、画面が閉じられます。

Email タブ

Email タブ（図 95）を選択し、ラン完了時に E メールを受信したいアドレスを入力します。この項目横のチェックボックスをチェックしておくと、E メールにデータファイルやレポートファイルを添付できます。

Configure Outgoing Email ボタンをクリックしてオプションウインドウ（図 95）を開き、SMTP サーバー設定によってコンピュータからテスト E メールの送信を行います。以下の項目欄に入力してください。

- **SMTP Server Name：**プロバイダーから提供された SMTP サーバー名称
- **Port：**プロバイダーから提供された SMTP サーバーのポート番号。通常、25 になります。
- **Use SSL：**SSL（暗号化プロトコル）使用または不使用。SMTP サーバーによっては必要となる場合があります。
- **Use Default ″From″ Address：**通常は初期設定としてチェックしておきます。ただし、SMTP サーバーによっては、<name>@YourCompany.com.など特定ドメインから得られた″from″アドレスがいずれの送信メールにも必要となる場合があります。この場合には、このボックスのチェックを外すことによって、有効な″from″E メールアドレスをボックス表示された″From″ Address に送信されるようにします。
- **Authentication Required：**SMTP サーバーはほとんどの場合、認証が必要となります。その場合は、ボックスをチェックし、ユーザー名およびパスワードを入力してください。
- **Test email：**E メール設定をテストするには、**Test Email Address** のテキストボックスに 1 件以上の E メールアドレスを入力してください。複数の E メールアドレスはコンマで区切ってください。最後に、**Test Email** ボタンをクリックします。

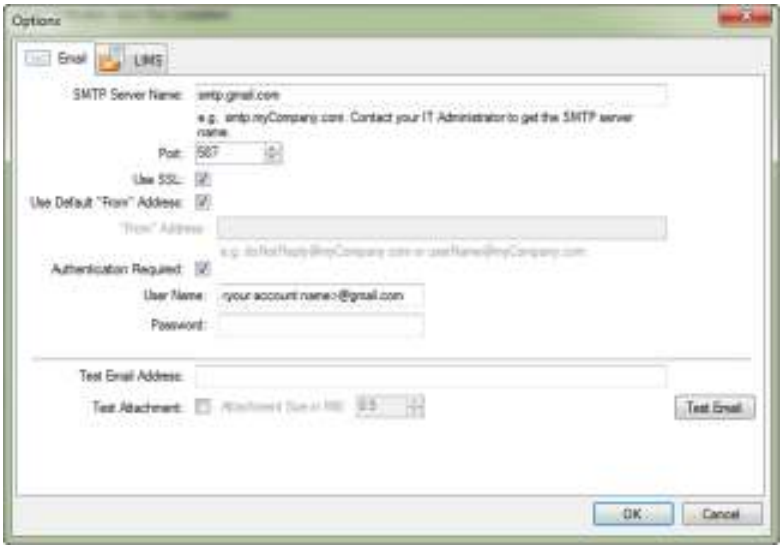


図 95 E メール設定項目

注意：SMTP サーバーによっては、ファイルなどの添付が不可能であり、あるいは添付ファイルの容量が制限されている場合があります。CFX Manager ソフトウェアによって

データファイルやレポートをEメール送信する場合は、Test Attachment ボックスをチェックし、添付可能なファイルサイズを 5MB 以上に設定することにより、サーバー性能のチェックが必要な場合があります。

Files タブ

Files タブを選択すると、以下のとおり、ファイルの開示および保存での初期設定位置が表示されます(図 96)。

- **Default Folder for File Creation:** 新しいファイルを保存したい初期設定フォルダを選択します。各ファイルタイプ (プロトコール、プレート、データまたは Gene Study ファイル) の保存位置を選択してください。
- **File Selection for Experiment Setup:** ランセットアップウィンドウで表示される初期設定プロトコールおよびプレートファイルを選択します。
- **Data File Prefix:** データファイルのファイル名称の開始テキストを指定します。このデフォルト設定によって、ユーザー(現在ソフトウェアにログオンしているユーザー名称)、日付(ファイル作成期日)および機器システムの名称(シリアル番号または名称)から始まるファイル名称が自動作成されます。

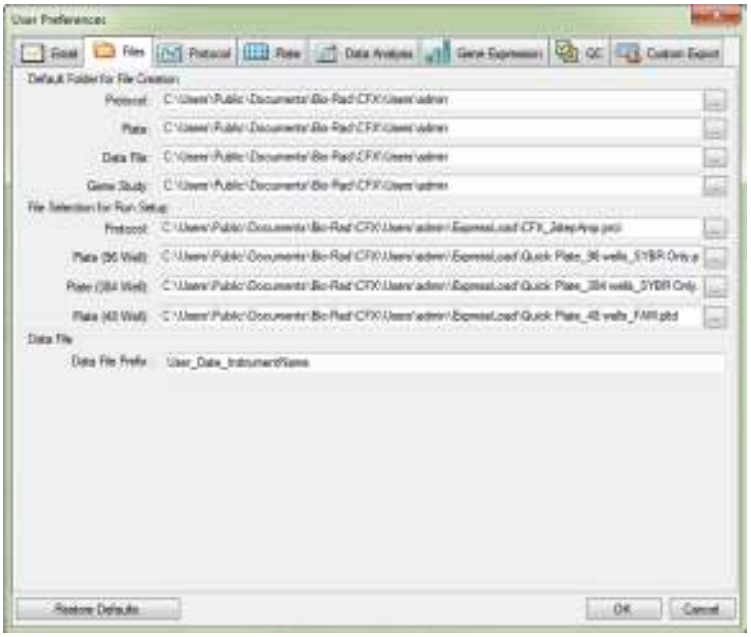


図 96 User Preferences ウインドウの Files タブ

アドバイス:各ボックス右の"...."ボタンをクリックすると、ウインドウが開き、フォルダ位置が示されます。

Protocol タブ

User Preferences ウインドウの **Protocol** タブを選択し、Protocol Editor ウインドウの新規プロトコールファイルの初期設定値を定めます(図 97)。

- **Protocol Editor:** プロトコールエディターに表示される初期設定を行います。プレート内の各ウェルに含まれるサンプル容量(μL)を示すために、初期設定 Sample Volume を

選択します。また、ラン実行時にリッドヒーター機能停止用の温度を設定するため、Lid Shutoff Temperature を選択します。

- **Protocol AutoWriter:** Protocol AutoWriter に表示される初期設定値を選択します。アニーリング温度の初期設定値を入力します。また、iProof、iTaq、その他ポリメラーゼを使用する実験用のアンプリコン長さについて、その初期設定値を入力します。

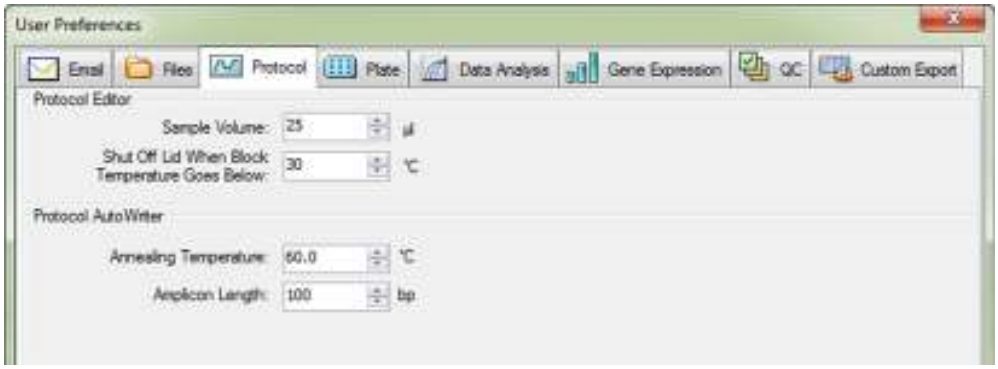


図 97 User Preferences ウインドウの Protocol タブ

Plate タブ

User Preferences ウインドウの **Plate** タブをクリックして、Plate Editor ウインドウの新規プレートファイルに表示される以下の初期設定値を指定してください（図 98）。

- **Plate Type:** リストからプレート内の初期設定ウェルタイプを選択します。
- **Plate Size:** リストから初期設定プレートサイズを選択します。
- **Units:** 標準物質を含むウェル内容物濃度の単位を選択します。ソフトウェアではこの単位で Data Analysis Quanfitication タブでの検量線が作成されます。
- **Scientific Notation:** 濃度単位の表記パターンを変更します。
- **Scan Mode:** ラン実行時にスキャンするチャンネル数を設定するため、初期設定スキャンモードを選択する。
- **Fluorophores:** Plate Editor の well loading controls に表示される初期設定蛍光色素を、チェックボックスをクリックすることで選択します。
- **Libraries:** 実験でおもに使用するターゲットおよびサンプル名称を入力します。遺伝子および配列リスト（Target Names）にターゲット名称を入力します。実験サンプルリスト（Sample Names）にサンプル名を入力します。なお、名称リストは、Experiment Settings ウインドウのターゲットおよびサンプルリストの名称に表示されます。

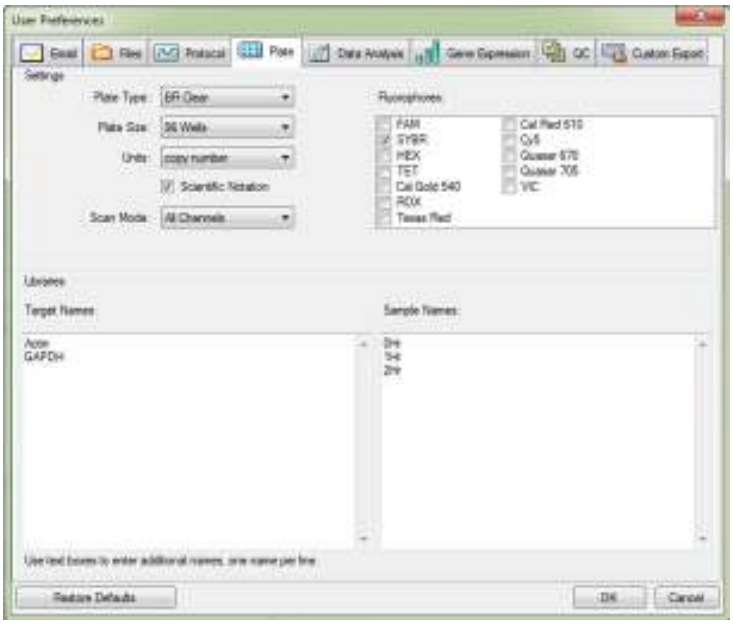


図 98　User Preferences ウインドウの Plate タブ

Data Analysis タブ

User Preferences ウインドウの **Data Analysis** タブを選択すると、Data Analysis ウインドウに表示される初期設定値を変更することができます（図 99）。

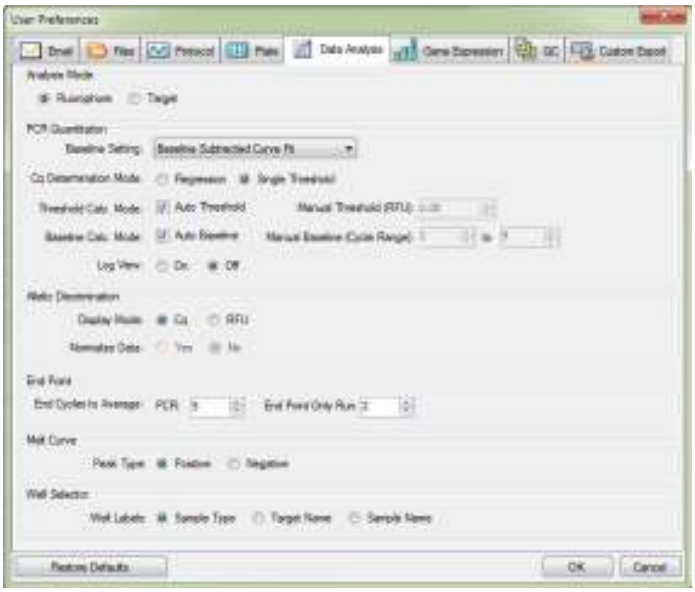


図 99　User Preferences ウインドウの Data Analysis タブ

Analysis Mode では、Fluorophore か Target によるデータを解析するように選択します。

PCR Quantification では、以下の設定項目を選択します。

- **Baseline Setting**：解析モードでのベースラインに関する初期設定方法を選択します。"Baseline Subtracted Curve Fit"（ベースライン補正曲線フィット）、"Not Baseline Subtracted"（ベースライン補正なし）または"Baseline Subtracted（ベースライン補正あり）"をいずれか選択します。
- **Cq Determination Mode**：Regression（回帰法）モードまたは Single Threshold（単一閾値）モードを選択して、各蛍光トレースでの定量サイクル値を求めます。
- **Threshold Calc. Mode**：Auto Threshold と Manual Threshold のモードを選択します。もし Manual を選択した場合、閾値の位置は特定の相対蛍光値（RFU）をセットします。その後のランからのデータファイルはこの閾値設定が適用されます。
- **Baseline Calc. Mode**：Auto Baseline と Manual Baseline のモードを選択します。もし Manual を選択した場合、すべてのトレースでベースラインを決定するためのサイクルレンジは特定の値を元にセットします。その後のランからのデータファイルはこのサイクルレンジが適用されます。
- **Log View**：**On** の選択により、増幅データの半対数グラフが表示されます。**Off** の選択により、線形グラフが表示されます。

Allelic Discrimination では、以下の設定項目を選択します。

- **Display Mode**：**RFU** の選択により、 RFU グラフとしてデータが表示されます。**Cq** を選択すると、定量サイクルのグラフで表示されます。
- **Normalized Data**：この項目は RFU を選択する場合に限り、使用可能となります。**No** を選択すると、非正規化データが表示され、**Yes** を選択すると、対照サンプルに対しデータが正規化されて表示されます。

End Point では、以下の設定項目を選択します。最終サイクル数を選択し、エンドポイント計算時に平均値を得ます。

- **PCR**：PCR サイクル数を入力し、定量データの最終サイクルの平均値を得ます（初期設定値は 5）。
- **End Point Only Run**：エンドポイントに限定したランのサイクル数を入力し、エンドポイントデータの最終サイクルの平均値を得ます（初期設定値は 2）。

Melt Curve では、Positive（正）または Negative（負）ピークのどちらかで検出するかを選択します。
Well Selector では、ウェルを Sample Type、Target Name、または Sample Name のいずれかでラベルするかを選択します。

Gene Expression タブ

User Preferences ウインドウで Gene Expression タブを選択すると、新しい遺伝子発現データファイルの初期設定値を変更することができます（図 100）。

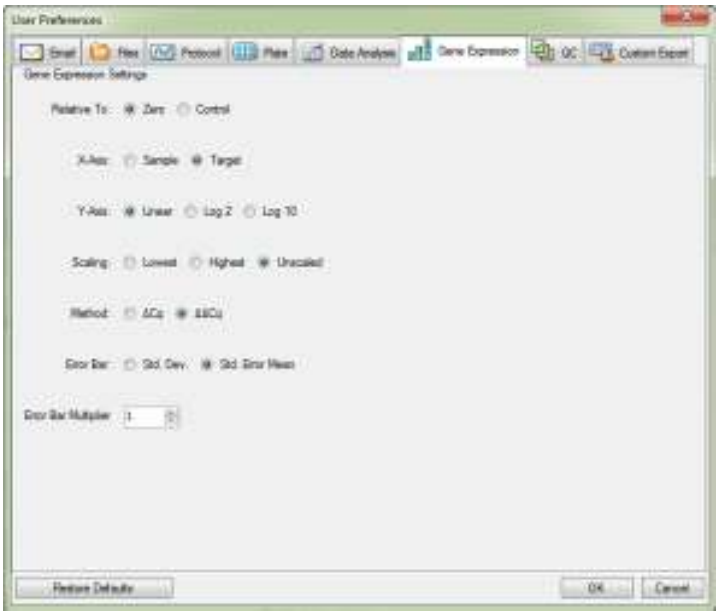


図 100 User Preferences ウインドウでの Gene Expression タブ

以下の項目について、新規の Gene Expression データファイルの初期設定値を変更してください。

- **Relative to**：Control または Zero を選択します。1 を始点とする遺伝子発現データをグラフ化する場合は、**Control** を選択します。Experiment Settings ウインドウに対照サンプルを指定した場合は、対照と比較した場合の相対値が自動的に計算されます。**Relative to Zero** を選択すると、対照なしと自動判断され、Experiment Settings ウインドウに対照サンプルを指定していない場合は初期設定が選択されます。
- **X-Axis**：グラフ x 軸にターゲットまたはサンプル名称を選択します。
- **Y-Axis**：グラフ y 軸のスケールを線形、Log 2 または Log 10 から選択します。
- **Scaling**：グラフの基準化について選択します。Unscaled を選ぶとグラフが基準化されません。Highest または Lowest を選ぶと、グラフがそれぞれの値で基準化されます。
- **Method**：初期設定とする解析モードとして正規化発現（ΔΔCq）または 相対発現（ΔCq）をいずれか 選択します。
- **Error Bar**：標準偏差の場合は Std Dev を選び、平均の標準誤差は Std. Error Mean を選びます。
- **Error Bar Multiplier**：グラフエラーバーでの標準偏差の乗数を選択します。初期設定は 1。2 または 3 に変更できます。

QC タブ

User Preferences ウインドウの **QC** タブを選択すると、Data Analysis モジュールのデータに適用する QC ルールを特定することができます。ソフトウェアでは、可能なテストおよび割り当て値に対しデータの妥当性確認が行われます（図 101）。

注意：右クリックメニューにより、Data Analysis ウインドウの QC モジュール解析から、QC パラメータ不良にあるウェルを除外することが可能です。

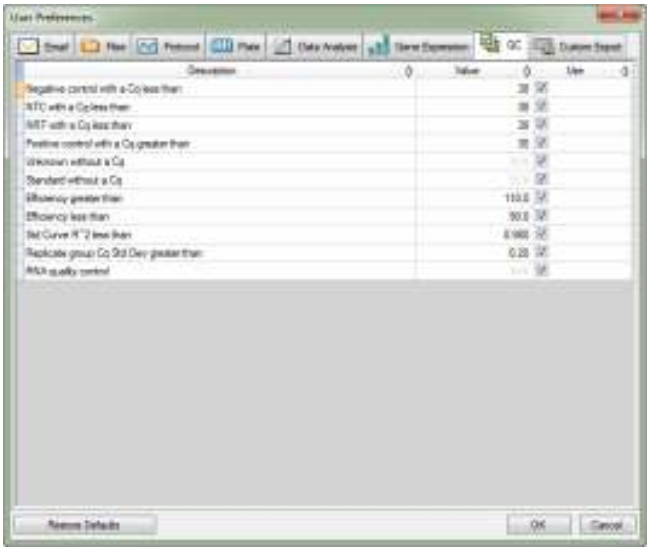


図 101 User Preferences ウインドウの QC タブ

カットオフ値を追加し、以下に示す QC ルールを利用可能とするかどうかを特定してください。

- Negative control with a Cq less than XX：陰性対照の Cq カットオフ値を入力します。
- NTC (no template control) with a Cq less than XX：NTC の Cq カットオフ値を入力します。
- NRT (no reverse transcriptase control) with a Cq less than XX：NRT の Cq カットオフ値を入力します。
- Positive control with a Cq greater than XX：陽性対照の Cq カットオフ値を入力します。
- Unknown without a Cq：Cq を伴わない不明物質
- Standard without a Cq：Cq を伴わない標準物質
- Efficiency greater than XX：検量線から算定された増幅効率のカットオフ値を入力します。
- Efficiency less than XX：検量線から算定された増幅効率のカットオフ値を入力します。
- Std Curve R^2 less than XX：検量線の相関係数のカットオフ値を入力します。
- Replicate group Cq Std Dev greater than XX：各複製グループで算定したカットオフ標準偏差を入力します。

Custome Export タブ

Custom Export タブを選択することで、出力するフィールドと Custom Export オプションで選択された時の出力するフォーマットについての初期設定を決めます（図 102）。

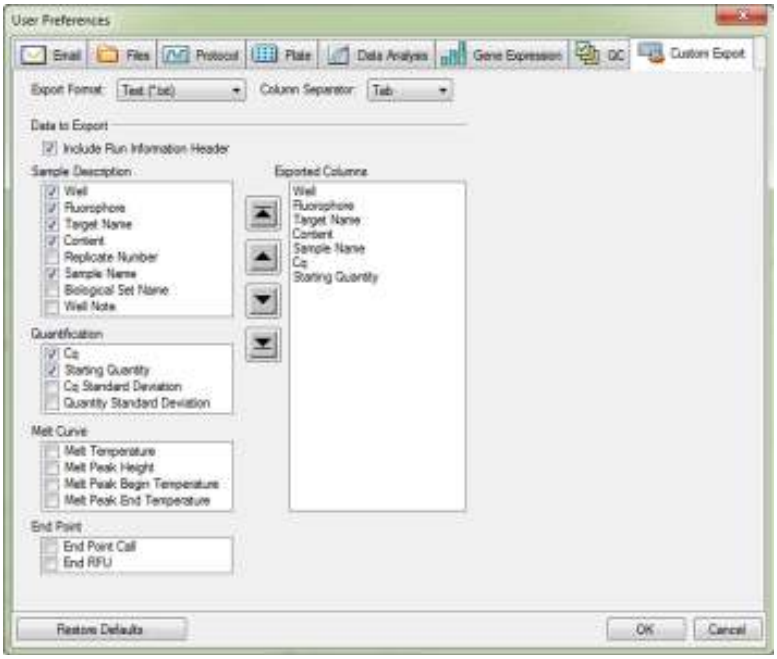


図 102 User Preferences ウインドウの Custom Export タブ

ファイル出力フォーマットとしては、text（*.txt）、CSV（*.csv）、Excel2007（*.xlsx）、Excel2003（*.xls）、XML（*.xml）、HTML（*.html）が含まれます。
以下のアイテムが出力として選択が可能です:

- **Sample Description**：Well、Fluorophore、Target Name、Content、Replicate #、Sample Name、Biological Set Name、そして Well Note。
- **Quantification**：Cq、Starting Quantity、Cq Standard Deviation、そして Quantity Standard Deviation。
- **Melt Curve**：Melt Temperature、Peak Height、Melt Peak Begin Temperature、そして End Temperature
- **End Point**：End Point Call、そして End RFU

選択されたアイテムの並び順はアイテムをハイライトさせて、Exported Column リストの左にある矢印ボタンを使って上下に動かして、変更することができます。

注意: User Preferences タブのいずれで Restore Defaults を選択すると、すべてのユーザー基本設定オプションを工場出荷状態に戻します。

ユーザー管理

次のいずれかの方法により、User Administration ウインドウを開きます。

- **Users > User Administration** の順に選択します。
- メニューバーの **User Administration** をクリックします。

管理者としてログオンしている場合であれば、メニューバーの User Administration ウインドウ

を開いてユーザーおよびその権限について管理します。

- **Manage Users:** ユーザーの追加または削除のほか、各ユーザーの役割を指定できます。
- **Manage Rights:** 各ユーザー(Principal(代表ユーザー)、Operator(オペレーター)または Guest(ゲスト))役割の権限を変更することができます。
  注意:管理者に限りこのウインドウ内容を変更することができます。その他のユーザーは閲覧のみ可能です。

各ユーザーの役割を指定するには、User Preferences ウインドウの役割リストから選択します(図 103)。図 103 の例では、ゲストユーザーにファイル保存の権限が加えられています。

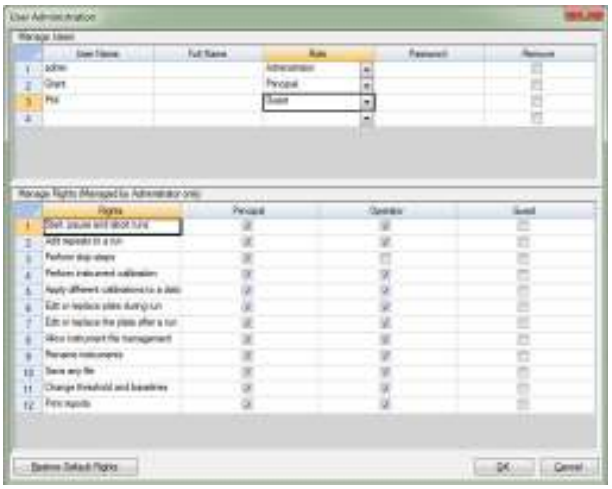


図 103 3 名のユーザーが登録されている状態の User Preferences ウインドウ

ソフトウェアユーザーの追加・削除

管理者に限って、ユーザー登録を追加・削除できます。以下の手順により、Manage Users ペインに、ユーザーを追加してください。

1. 新しいソフトウェアユーザーのとして User Name を入力します。
2. ユーザーの役割を選択します。この役割によって各ユーザー権限が制限されます。なお、初期設定の役割は Principal(代表ユーザー)となります。
3. (オプション)新しいソフトウェアユーザーのフルネームおよびパスワードを入力する。
4. **OK** をクリックします。その後、ウインドウを閉じることを確認するダイアログボックスが開きます。
5. **Yes** をクリックして、ダイアログボックスとウインドウを閉じます。

ソフトウェアユーザーを削除する場合は、以下の手順となります。

1. Manage Users 表示部分で削除したいソフトウェアユーザーの Delete リスト内のボックスをクリックします。
2. **OK** をクリックします。その後、ウインドウを閉じることを確認するダイアログボックスが開きます。
3. **Yes** をクリックし、ダイアログボックスとウインドウを閉じます。
   注意:ソフトウェアユーザーのリストには、必ず Administrator(管理者)を 1 名登録してください。

ユーザー役割の権限指定

User Administration ウインドウでは、ユーザー役割とその権限が表示されます。以下の役割が 4 つ設定されています。

- **Administer（管理者、必須）:** この管理者には権限がすべて与えられており、その内容は変更できません。ソフトウェアユーザーの追加削除、役割権限の変更などを行うことができます。
- **Principal（代表ユーザー）:** 初期設定では、権限がすべて与えられます。
- **Operator（オペレーター）:** 初期設定では、サイクルのスキップ、Gene Study の作成を除いた役割権限が与えられます。
- **Guest（ゲスト）:** 初期設定では、役割権限は与えられておらず、ファイルを閲覧することのみ可能です。

以下の手順で役割の権限を指定してください。なお、管理者のみ役割権限を変更することができます。

1. Manage Rights 表示部分にて、役割表示下のボックスをクリックして、権限を追加・削除します。初期設定リスト上の役割の権限をすべて変更する場合は、**Restore Default Rights** をクリックしてください。
2. **OK** をクリックします。その後、ウインドウを閉じることを確認するダイアログボックスが開きます。
3. **Yes** をクリックして、ダイアログボックスとウインドウを閉じます。

現時点でのユーザー役割および権限を表示するには、**User > User Administration** の順に選択します。ユーザー管理ウインドウでのユーザー設定、役割や権限等を変更したい場合には、ソフトウェア管理者に申告してください。代表、オペレーターまたはゲストの各ユーザーには、ユーザー設定、役割および権限は変更できません。

11 第 11 章－情報サービス

11　情報サービス

本章では、CFX96 Touch および CFX384 Touch システムの情報サービスに関して解説します。

- 自動のソフトウェアと機器のアップデート（160 ページ）
- サーマルサイクラー部からのデータファイル回収（161 ページ）
- LIMS 統合（161 ページ）
- キャリブレーションウィザード（166 ページ）
- 機器メンテナンス（168 ページ）
- Application Log（アプリケーションログ）（170 ページ）
- トラブルシューティング（171 ページ）
- 参考文献 （173 ページ）

自動のソフトウェアと機器のアップデート

ソフトウェアと機器は CFX Manager ソフトウェアを使うことで自動的にアップデートが可能です。

アップデートの適用には3つの方法によって決めることができます。

1. CFX Maneger ソフトウェアは起動する際とソフトウェアが実行中の間、新しい機器がコンピュータに接続される度に、毎回アップデートがあるかどうかのチェックを自動で行います。
2. 適用できるアップデートを示すメッセージは CFX Manager ソフトウェアのメインウインドウの下部に表示されます。このメッセージをクリックすると、Updates ウインドウが現れます。
3. **Help > Check For Updates** を選択します。

アップデートが適用できる時、Update ウインドウが以下のオプションを与えます。

- ソフトウェアアップデートのみが適用できるのであれば、Update を選択します。
- ソフトウェアと機器の両方が適用できるのであれば、初期設定では両方のアップデータとをチェックします。ソフトウェアのアップデートは適切な通信を確保するために接続された機器いずれについて、機器のアップデートが必要です。
- ソフトウェアアップデートボックスのチェックをはずすことでソフトウェアのアップデート無しに、機器のアップデートができます。

ソフトウェアと機器両方のアップデータを選択した時、ソフトウェアはアップデートされ、再起動し、機器のアップデートが開始されます。機器はこれらのアップデートを完了させてから、機器は再起動の必要があります。
最新のアップデートをダウンロードするには、CFX Manager ソフトウェアが実行中のコンピュータがインターネットに接続されていないといません。アップデートが開始される前に、すべてのデータ解析ウインドウは閉じて、すべての機器はアイドル状態でなければなりません。
機器がコンピュータに接続されている時、CFX Managerソフトウェアはインストールされた CFX Manager のバージョンに互換性についてチェックします。もし機器ソフトウェアに互換性がなかったら、このソフトウェアは自動的にアップデートされます。この操作にはインターネット接続の必要はありません。
新しいアップデートが適用できる時にいつも現れるアップデートウインドウを表示させないようにするには、Updates ウインドウ内の **Nofify when updates are available** ボックスのチェックをはずします。Updates ウインドウを再びポップアップさせるようにするには、メインソフトウェアのメニューバーから **Help > Check for Updates** を選択し、**Notify when updates are available** ボックスをチェックします。

注意: MiniOpticon では、CFX Manager ソフトウェアを使ってのアップデートはできません。

サーマルサイクラー部からのデータファイル回収

サーマルサイクラー部にあるデータファイルは接続されたコンピュータのハードディスクに回収することができます。ファイルの回収は、以下のステップです。

1. メインソフトウェアウインドウの、Detected Instruments ペインから機器を選択します。
2. 右クリックして、**Retrieve Data Files…**を選択します。
3. 回収ファイルの保存のフォルダ場所を指定します。
4. **Okay** をクリックします。
   注意: サーマルサイクラー部のリアルタイム PCR データフォルダにある全てのファイルはコンピュータに回収されます。

LIMS 統合

CFX Manager ソフトウェアは Laboratory Information Management System（LIMS）の使用のために構成することができます。LIMS 統合のために、CFX Manager ソフトウェアは LIMS プラットフォーム（LIMS ファイル、*.plrn）によって生成されるプレート設定情報、CFX Manager ソフトウェアを使用して作られるプロトコールファイル、定義されたデータ出力場所、そして定義された出力フォーマットが必要です。

LIMS フォルダとデータ出力オプションの設定

1. メインソフトウェアのメニューバーから Tools > Options を選択して、LIMS タブを選択して、LIMS プロトコール（*.prcl）、LIMS ファイル（*.plrn）と出力データを含むフォルダ場所を定義します。

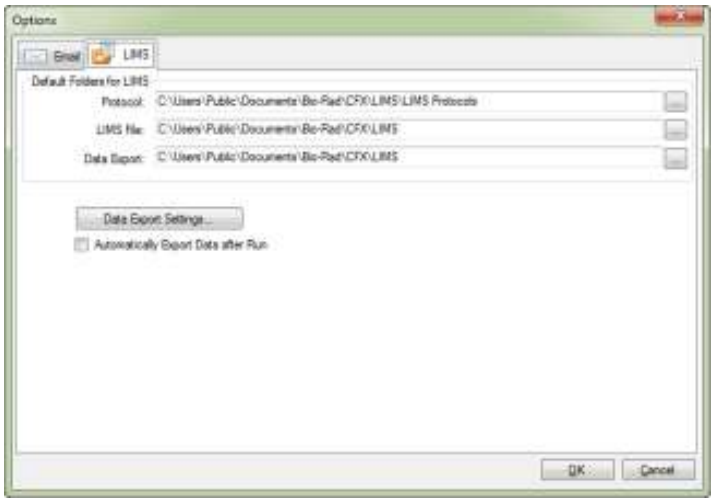


図 104　LIMS 設定タブで表示している Options ウインドウ

2. ランの完了では、LIMS データ出力ファイルが CFX Manager ソフトウェアの*.pcrd データファイルに加えて、自動的に生成されます。**Automatically Export Data after Run** ボックスをチェックすることで、ランが完了すると、自動的にデータ出力が行われます（図 104）。
3. **Data Export Settings** ボタンをクリックすると、出力するデータに使用されるファイルをフォーマットで、どの情報フィールドを出力するかを指定できます（図 105）。

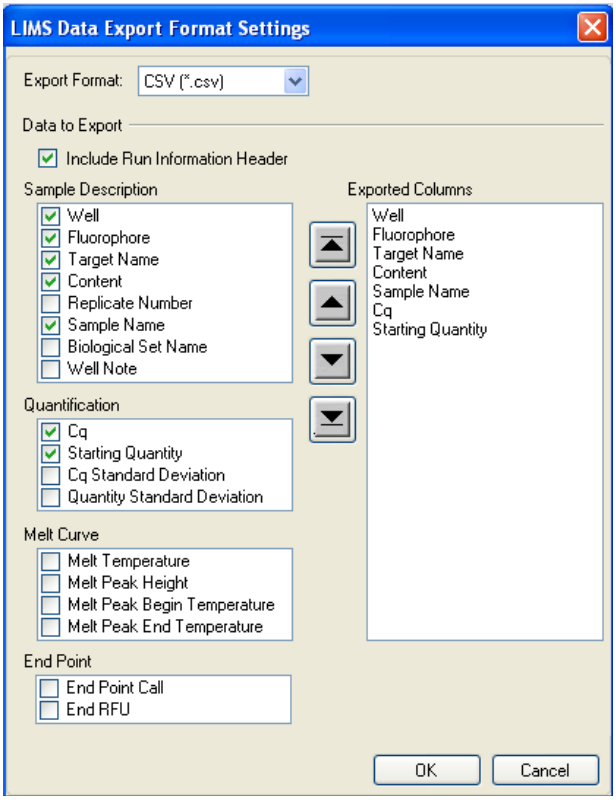


図 105　LIMS Data Export Format Settings ウインドウ

LIMS プロトコールの作成

LIMS ランを開始するには、CFX Manager ソフトウェアプロトコールファイル(*.prcl)は Options ウインドウの LIMS タブで指定した LIMS プロトコールフォルダ保存場所に生成、保存しなければなりません。

LIMS ファイルの作成

LIMS ファイル(*.plrn)はプレート設定詳細とプロトコールファイル名を含んでいます。このファイルはインターナル LIMS によって生成されます。CFX Manager ソフトウェアは LIMS ファイルを使用して、使用するプレートファイルを作成に LIMS ファイルを使用します。プレートファイルはランを開始し、データを生成するためには、名付けされたプロトコールファイルとともに関連付けて使用されます。

LIMS スペシャリストによって、以下のステップを実行されるべきです。

1. メインソフトウェアのメニューバーから Tools > User Data Folder > Sample files > Templates を選択します。
2. CFX96 Plate Import Template.csv または CFX384 Plate Import Template.csv のいずれかを選択して、インターナル LIMS にインポートします(図 106)。

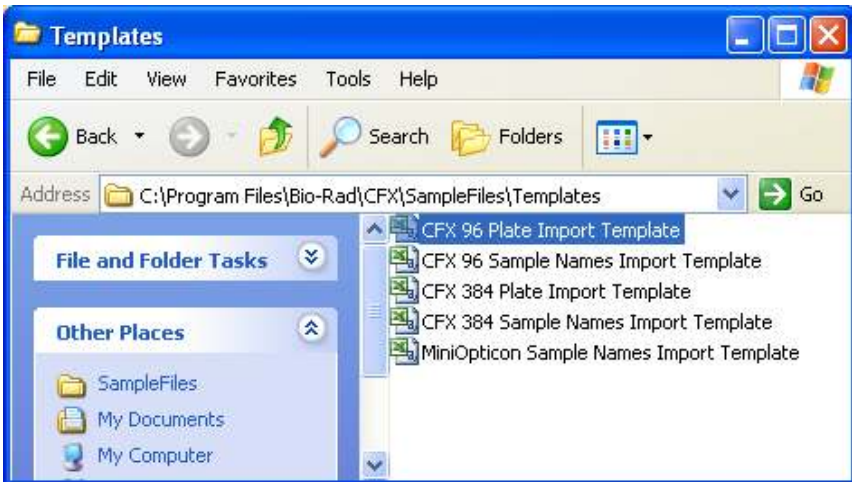


図 106 LIMS CFX96 Plate Import Template を開いたところ

3. LIMS を使用して、表 44 でリストされた必要なフィールドを埋めることによってテンプレートを完成させます。
4. 定義した LIMS ファイルのフォルダ場所に直接拡張子.plrn を持ったテンプレートを保存します。

   警告: .csv から.plrn に拡張子を変更することは、CFX Manager ソフトウェアにファイルを認識させて、LIMS ランを開始するために必要です。

   アドバイス: 定義された LIMS ファイルのフォルダ場所をすばやく確認するには、メインソフトウェアのメニューバーから Tools > LIMS File Folder を選択します。

表 44 LIMS .csv ファイル内容の定義

列	行	説明	内容	目的
A	1	Plate Header	編集不可	定義済
A,B,C	2	Field/Data/Instruction	編集不可	定義済
B	3	Version	編集不可	定義済

表 44 LIMS .csv ファイル内容の定義(続き)

列	行	説明	内容	目的
B	4	Plate Size	編集不可	定義済
B	5	Plate Type	“BR White”、”BR Clear”、もしくは他にキャリブレートされたプレートタイプを入力	必須
B	6	Scan Mode	“SYBR/FAM Only:,” 、 ”All Channels,”または”FRET.”を入力	必須
B	7	Units	以下いずれか一つを入力。“copy number,”、“fold dilution,”、“micromoles,”、“nanomoles,”、“picomoles,”、“femtomoles,”、“attomoles,”、“milligrams,”、“micrograms,”、“nanograms,”、“picograms,”、“femtograms,”、“attograms,”、“percent.”	必須
B	8	Run ID	今回のランを特定する短い説明もしくはバーコードを入力	オプション
B	9	Run Note	ランの説明を入力	オプション
B	10	Run Protocol	リスト化された正確なプロトコールファイル名を入力	必須
A	11-15	TBD/Empty	編集不可	定義済
A	16	Plate Data	編集不可	定義済
A	14-110	Well Position	編集不可	定義済
B-G		Ch1 Dye, Ch2 Dye, Ch3 Dye, Ch4 Dye, Ch5 Dye, FRET	使用する各チャンネルでのキャリブレートされた色素名(例 “FAM”)を入力	必須
H		Sample Type	以下のサンプルタイプから一つを入力。“Unknown,”、“Standard,”、“Positive Control,”、“Negative Control,”、“NTC,”、“NRT.”	必須
I		Sample Name	サンプル名を入力	オプション
J-O		CH1 Target, CH2 Target, CH3 Target, CH4 Target, CH5 Target, FRET Target	使用する各チャンネルでのターゲット名を入力	オプション
P		Biological Set Name	生物学的セット名を入力	オプション
Q		Replicate	リプリケートの各セットの正整数を入力。ゼロすることはできない。	オプション
R-W		CH1 Quantity, CH2 Quantity, CH3 Quantity, CH4 Quantity, CH5 Quantity, FRET Quantity	スタンダードの量値を入力。10 進法で濃度を入力。	すべてのスタンダードで必須
X		Well Note	ウェルメモを入力	オプション

表 44 LIMS .csv ファイル内容の定義(続き)

列	行	説明	内容	目的
Y-AD	14-110	Ch1 Well Color, Ch2 Well Color, Ch3 Well Color, Ch4 Well Color, Ch5 Well Color, FRET Well Color	32 ビット整数(argb)10 進法フォーマットでユーザー定義のトレーススタイルの色を入力	オプション

LIMS ランの開始

LIMS ランを開始するには:

1. LIMS ファイルを以下の方法のひとつで開きます:
   - CFX Manager ソフトウェアウインドウもしくはデスクトップのアイコン上に.plrn ファイルをドラッグ&ドロップします。
   - メインソフトウェアウインドウのメニューバーから Tools > LIMS File Folder を選択します。目的の.plrn ファイルをダブルクリックすることでランを開きます。
   - メインソフトウェアウインドウのメニューバーから File > Open > LIMS file を選択します。LIMS フォルダから.plrn ファイルを選択して、Open をクリックします。

2. 選択された LIMS ファイルのためのランを開始するために、機器を選択して、Start Run をクリックします(図 107)。

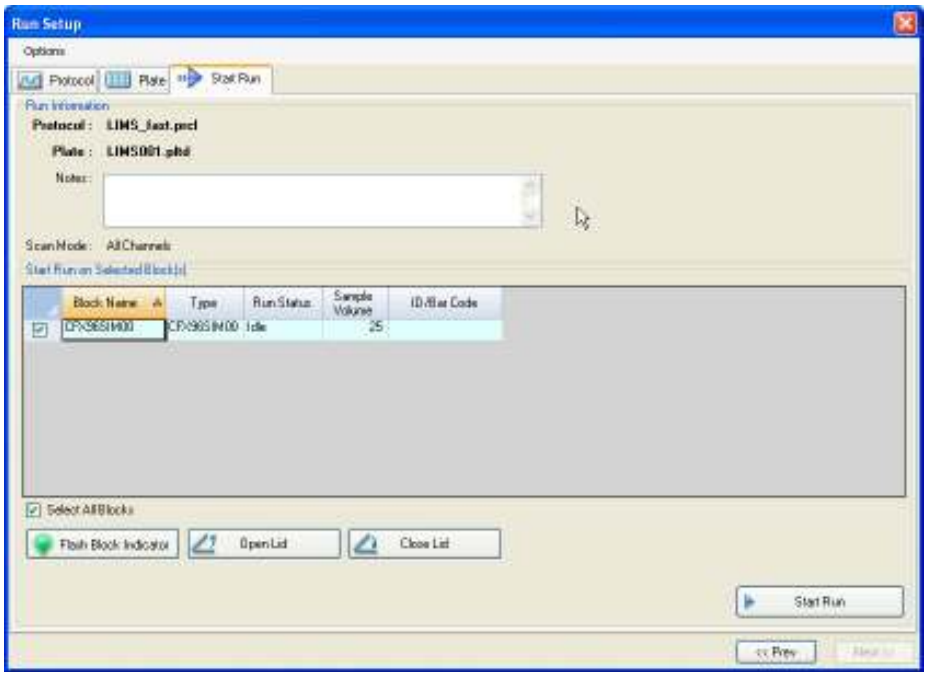


図 107 LIMS ランを開始準備状態の Run Setup ウインドウ

LIMS へのデータ出力

ランが完了して、CFX Manager ソフトウェアデータ(.pcrd)ファイルが生成されて、定義されたデータ出力フォルダ場所に保存されます。

Automatically Export Data after Run が LIMS Options で選択されていたら、LIMS データ検索と互換性のある2つのデータファイルが同じ場所に保存されます。ファイルフォーマットと内容は LIMS Data Export Format 設定を使用して定義されます。手動でこのデータを出力するには、メインソフトウェアウインドウのメニューバーから **Export > Export to LIMS Folder** を選択します。

キャリブレーションウィザード

CFX96 Touch システムでは、白色ウェルおよび透明ウェルプレートで高頻度に使用される蛍光色素に対し工場出荷時にキャリブレーションされています。また、CFX384 Touch システムでは、白色ウェルプレートで同一の高頻度に使用される蛍光色素に対しキャリブレーション処理済みです。

表 45 出荷前キャリブレーション済み蛍光色素、チャンネルおよび機器

蛍光色素	チャンネル	機器
FAM, SYBR® Green I	1	CFX96 と CFX384
VIC, HEX, TET, CAL Fluor Gold 540	2	CFX96 と CFX384
ROX, TEXAS RED, CAL Fluor Red 610	3	CFX96 と CFX384
CY5, Quasar 670	4	CFX96 と CFX384
Quasar 705	5	CFX96 のみ

このほか、CFX96 Touch または CFX384 Touch システムは、FRET ケミストリーに適したチャンネルを含みます。このチャンネルに対しては、特定の蛍光試薬のキャリブレーションが不要です。

キャリブレーションするため、以下の手順により Calibration Wizard 画面を開いてください。

1. Detected Instruments ペインにて装置を 1 台選択します。
2. **Tool > Calibration Wizard** の順に選択し、ウインドウを開いて、新しい蛍光色素およびプレートの組み合せに対しキャリブレーションします(図 108)。

図 108 には、Dye Calibration ウインドウの表示例を示します。

図 108 Dye Calibration ウインドウ

CFX96 Touch および CFX384 Touch システムのキャリブレーション

以下の手順により、蛍光試薬キャリブレーションウインドウにて CFX96 Touch および CFX384 Touch システムをキャリブレーションしてください。

1. Calibratte New or Existing Fluorophores ペインにて、プルダウンメニューからキャリブレーションしたい蛍光色素を選択します。希望する蛍光色素がリストにない場合は、ボックスにその名称を入力してリストに追加してください。
2. プレートタイプを選択します。希望する蛍光色素がリストにない場合は、ボックスにその名称を入力してリストに追加してください。
3. 蛍光色素のチャンネルを選択します。
4. **Add to List** ボタンをクリックし、蛍光色素を追加します。プレートを消去する場合は、**Clear List** をクリックし、蛍光色素をすべて削除してください。
5. (オプション)プレートに対してキャリブレーションを予定する蛍光色素を追加する場合には、上記 1～6 の手順を繰り返してください。
6. 蛍光色素データの追加が完了すれば、**View Plate** をクリックして Pure Dye Plate Display 画面を開きます。このウインドウは、プレートに蛍光色素を設定する際の案内ガイドとなります。
7. Pure Dye Plate Display 画面にパターンが表示されれば、蛍光色素キャリブレーション用の 96 ウェルまたは 384 ウェルプレート調製を開始し、各ウェルに蛍光色素溶液を分注します。蛍光色素ごとに、50 μL(96 ウェルプレート)または 30 μL(384 ウェルプレート)の 300 nM 蛍光色素溶液を 4 つのウェルに注入します。なお、プレート内の半分以上は空のウェルを含めてください。
8. 実験に使用する方法でプレートをシーリングします。
9. ブロック内にキャリブレーションプレートをセットし、リッドを閉じます。さらに、**Calibrate** ボタンをクリックした後、**OK** をクリックしてプレートがブロック内にあることを確定します。

10. CFX Manager ソフトウェアによってキャリブレーションのランが完了すれば、ダイアログボックスが表示されます。**Yes** をクリックすると、キャリブレーションが終了し、Dye Calibration Viewer が表示されます。
11. **OK** をクリックし、ウインドウを閉じます。

機器メンテナンス

CFX96 Touch または CFX384 Touch システムは、データ収集時に高速で作動する高感度タイプのオプティカルシャトルシステムのほか、短時間での加熱冷却が必要となるサンプルブロックから構成されます。こうした構成部位にコンタミネーションが生じると、熱サイクルやデータ収集に悪影響が及びます。

警告！ サンプルチューブのふたが開いた状態や液漏れした状態で、機器を操作しないでください。試薬が漏出し、ブロック、インナーリッド、シャトルシステムのオプティカルヘッド部位に付着するおそれがあります。試薬が付着すると発生信号が不明瞭となるほか、蛍光試薬コンタミによってバックグラウンド信号が過剰発生するおそれもあります。なお、シャトルシステム部位のクリーニングは行わないでください。この部位に関しては、弊社技術サービス担当者がメンテナンスを行います。

以下の推奨方法に従って、CFX96 Touch システムおよび CFX384 Touch のコンタミネーションを予防してください。

- ブロック内部に容器を入れる際には、前もってその外側をクリーニングする。
- サンプルチューブについてふたが開いている、ゆるんでいる、穴があいている、損傷を受けている等の場合には、ランを行わないでください。ブロック、インナーリッド、オプティカルシステムにコンタミが生じます。
- 揮発性試薬の使用によって漏出しブロック、インナーリッド、オプティカルシステムのコンタミを生じる可能性がある場合は、PCR またはリアルタイム PCR 実験を行わないでください。
- 汚れ、バイオハザード物質、蛍光試薬などの付着を予防するため、ブロックとインナーリッドを定期的にクリーニングします（168 ページのオプティカルリアクションモジュールのクリーニングを参照）。
- インナーリッド内側のヒートプレート穴後方にあるオプティカルシステム部位には、絶対に触れないでください。またこの部位のクリーニングも行わないでください（図 104）。
- アウターリッドと C1000 Touch サーマルサイクラー本体を定期的にクリーニングします（C1000 Touch サーマルサイクラー取扱説明書を参照してください）

オプティカルリアクションモジュールのクリーニング

オプティカルリアクションモジュールは、C1000 Touch 本体とともに定期的にクリーニングしてください。その際、機能性に影響を及ぼす付着物や汚れなどを除去します。付着物を発見した場合やサンプル液が漏出した場合は、その時点で柔らかい布で拭き取ってください。こうして機器をクリーニングすることによって、その機能精度を維持することが可能となります。C1000 Touch のクリーニング方法は、取扱説明書を参照してください。

警告！アルミニウム腐食性のある洗浄液を使用しないでください。C1000 リアクションモジュールベイの表面を傷付けないようにしてください。損傷が生じると、温度制御の精度が低下します。

警告！C1000 リアクションモジュールベイを水や液体成分でこぼさないでください。サーマルサイクラーに電源が入っている際に濡れてしまうと、電気ショックの発生原因となります。

オプティカルリアクションモジュールのブロックやインナーリッドに付着物、漏出液、その他の

汚れなどが認められれば、速やかにクリーニングしてください。こうした汚れが付着したままで放置すると、短時間で温度増減する高精度の蛍光データを得るためのブロック機能性が低下します。このため、以下の方法により、リアクションモジュールをクリーニングしてください。

警告！電気ショックを避けるため、クリーニングを行う前にサーマルサイクラー本体からリアクションモジュールを取り外し、サーマルサイクラーの電源プラグを外してください。

警告！ インナーリッド内側のヒートプレート穴後方にあるオプティカルシステム部位には、触れないでください。また、この部位に洗浄液などを付着させないでください（図 104）。

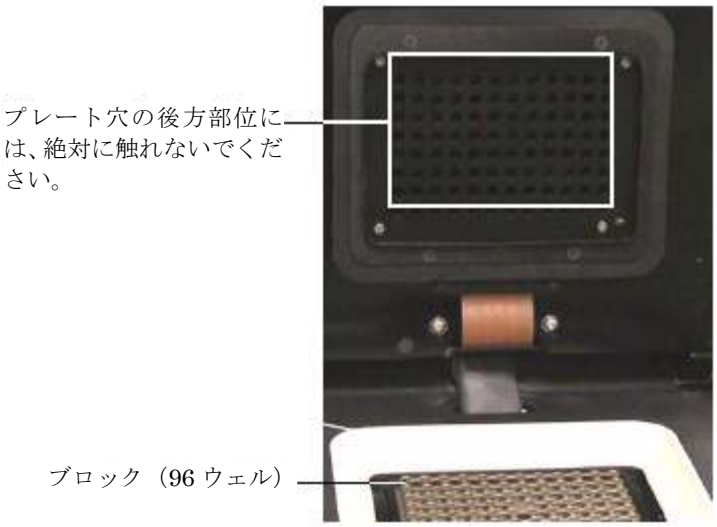


図 109 インナーリッドのヒートプレート穴

アドバイス：放射性物質またはバイオハザード物質の取扱いや洗浄方法については、使用施設で作成されている放射線安全性および生物学的安全性に関するガイドライン等を参照してください。こうしたガイドラインには、有害物質のクリーニング、管理、廃棄に関する方法が記載されています。

- **外面のクリーニング：**湿らせた布を用い、機器の外面に付着した汚れを除去します。必要に応じて、濃度のうすい石けん水を用いて洗浄し、水でよくすすいでください。こうした機器外面のクリーニングにより、腐食を防ぎます。
- **冷却フィンのクリーニング：**柔らかいブラシまたは湿らせた布でほこりを除去します。通気口の内部にほこりが詰まっている場合は、掃除機を使用してください。フィンに付着した汚れについては、柔らかい布を湿らせて拭き取ります。フィンの表面を傷つけないでください。必要に応じて、濃度のうすい石けん水を用いて洗浄し、水でよくすすいでください。フィンのクリーニングにより、サンプルを適正に加熱冷却することが可能となります。

  注意：漂白剤や研磨剤入りクリーナーなどアルミニウム腐食性の洗浄液は使用しないでください。
- **ウェル内部にオイルを使用しない：**やむを得ずオイルを使用した場合は、ウェルを十分にそのつど洗浄してください。変色や汚れが生じた場合は、オイルを除去してください。オイルに対するクリーニングには、95%エタノール液を使用します。ブロック内部にオイルをためないでください。
- **ブロック内部ウェルのクリーニング：**ブロック内部に試薬等が漏れた場合は、それが乾燥するまでに速やかに拭き取ってください。その際、水（推奨される）、95%エタノール、希釈比 1:100 の漂白剤をディスポピペットに入れて使用します。洗浄後は、柔らかい布やペーパータオルを用いてブロック内部を拭き取ります。また、洗浄液の成分などが残

らないように、あらかじめ水で十分にすすいでください。

警告！ 強アルカリ性洗浄液（洗浄力の強い石けん、アンモニア、高濃度の漂白剤など）をブロックのクリーニングに使用しないでください。腐食性または研磨性洗浄液も使用しないでください。こうした洗浄剤を使用すると、ブロックを損傷し、精度の高い温度調整が不可能となるおそれがあります。

警告！ ブロック内に、漂白剤、エタノールまたは石けん成分が残留すると、ブロックが腐食するおそれがあり、ランを行っている際にプラスチック部分が破損する可能性があります。このため、ブロック内に洗浄液の成分が残留しないよう、十分に水ですすいでください。

警告！ 洗浄液を添加した後にブロックを加熱しないでください。洗浄液が入った状態で加熱すると、ブロック、リアクションモジュールおよびサーマルサイクラー本体が損傷するおそれがあります。

- **インナーリッドのクリーニング：**濃度のうすい石けん水で湿らせた柔らかい布でインナーリッド表面の付着物や汚れを除去してください。表面を傷つけるような研磨剤入りの洗浄液やきめの粗い布地を用いないでください。インナーリッドのクリーニングにより、サンプルの加熱・冷却温度を正確に制御することが可能となります。

Application Log（アプリケーションログ）

新たにランが行われる前に、機器では自動診断テストが開始され、仕様範囲内で操作されていることがチェックされます。このテスト結果は、ソフトウェアによって Run Log および Application Log に記録されます。1 件以上の実験で問題が生じた場合には、ランおよびアプリケーション記録を開き、問題の発生時期を確認してください。

CFX Manager ソフトウェアでは、**Application Log** にラン実行時の機器状態に関する情報が記録されます（図 110）。こうした記録を用いて、機器やソフトウェアに生じた事象をトラブルシューティング時に追跡することができます。

メインソフトウェアウインドウでこのアプリケーションログを開くには、**View > Application Log** の順に選択してください。

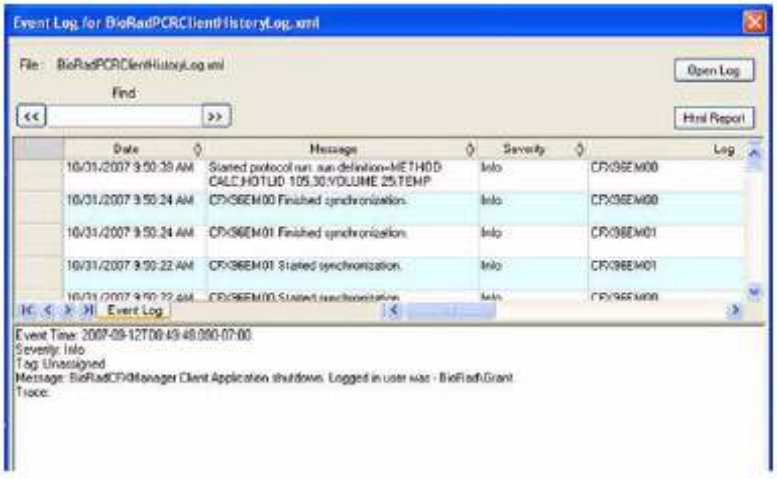


図 110 Event Log ファイルの例

トラブルシューティング

データファイルのリカバー

スタンドアローンランからのデータファイルは以下のステップでリカバーできます。

1. USB フラッシュドライブをサーマルサイクラー部の USB ポートに挿入します。
2. **Tools** ボタンにタッチします。
3. **Run Reports** を選択します。
4. リストからリカバーしたいファイルを選択します。
5. **Recover Data** ボタンをタッチします。新しいデータファイル(.zpcr)が生成され、USB フラッシュドライブに出力されます。
   注意:最終 5 ランのファイルのみリカバーできます。

一般に、ソフトウェアと機器間に交信トラブルが生じた場合は、コンピュータおよびシステムを再起動させると解消する場合があります。再起動させる前に、作業中のデータを必ず保存してください。

注意:使用するコンピュータのメモリに余裕があり、ハードディスクドライブに十分な空きがあることを確認してください。メモリは 2GB 以上、ハードディスク空き容量 20GB 以上が推奨されます。

サーマルサイクラー部からのログファイルの回収

サーマルサイクラー部に保存されているログファイルは接続しているコンピュータのハードドライブに回収が可能です。ファイルを回収するには、以下のステップで行います:

1. メインソフトウェアウインドウで、Detected Instruments ペインから機器を選択します。
2. 右クリックして、**Retrieve Log Files…**を選択します。
3. 回収したファイルを保存するためのフォルダ場所を指定します。
4. **Okay** をクリックします。

ソフトウェアの手動インストール

必要に応じて、以下の手順にてソフトウェアの手動インストールを行ってください。

1. ソフトウェアインストール用 CD-R をセットします。
2. ソフトウェア CD アイコンを右クリックし、**Explorer** を選択して CD ウインドウを開きます。
3. **CFX_Manager** フォルダをダブルクリックし、さらに、**setup.exe** をダブルクリックしてソフトウェアインストールウィザードを起動させます。
4. インストールウィザード画面に表示される手順に準じてください。その後、**Finish** をクリックして終了です。

ドライバの再インストール

必要に応じて、メインメニューから **Tools > Reinstall Instrument Drivers** を選択して、ドライバを再インストールしてください。

注意: もしリアルタイム PCR システムとのソフトウェア通信に問題があれば、ドライバを再インストールと USB 接続を確認した後、Bio-Rad のテクニカルサポートにご連絡ください。

電源トラブル

電源不良が生じた場合には、機器システムとコンピュータの電源がシャットダウンされます。電

源不良状態が短時間に回復すればプロトコールランは再開されますが、アプリケーションログにはその電源不良が記録されます。電源不良が生じていた時間の長短やコンピュータ設定に応じて機器とソフトウェアが作動するかどうかは、次のプロトコールステップごとに異なります。

- プロトコールのステップにプレートリードが含まれない場合は、機器に電源が回復した時点でランが再開されます。
- プロトコールのステップにプレートリードが含まれる場合は、ソフトウェアが再スタートし、データ収集用の交信が復帰するまで機器は作動しません。この状況において、ソフトウェアがコンピュータによってシャットダウンされていなければ、プロトコールが継続されます。コンピュータおよびソフトウェアが再作動すると、その後はプロトコールによるランが続けられます。

電源トラブルが長時間に及ぶ場合は、電動リッドを開いてサンプルをリアクションモジュールから取り出してください。その場合には、以下の手順によって固定プレートを取り外します。

1. C1000 Touch 本体からロッキングバーを降ろして、リアクションモジュールを取り外します。
2. 図 111 のとおり、机の前に取り外したモジュールを置き、モジュールの前面を机の角上で約 5 cm 引き伸ばします。

図 111 オプティカルモジュールのセットアップにより、ロックされているプレートを取り外すところ

3. ドライバを用い、リアクションモジュール前面隅にある大型の固定ネジ(リッドオープン用ボタン下)を取り外します。モジュール前面隅に位置する小型のネジは取り外さないでください。ネジが外れると、内部モジュールから固定具が外れる音が聞こえます。図 112 は、大型ネジの位置(2 ヵ所)を示します。

図 112 ネジを外し、オプティカルモジュールのロック解除するところ

4. リアクションモジュールのオープン用リッドを押します。固定具（濃い色のプラスチック部品）が付着していないことを確認します。ブロックから、サンプルを取り出します。

5. 固定具を元の位置に戻し、大型ネジ 2 本を締めることにより、リアクションモジュールとオープンリッドを組み立ててください。図 113 は、固定具を取り付けている部分を示します。

図 113 オプティカルモジュール固定ラッチ

参考文献

Breslauer KJ, et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence, Proc Nat Acad Sci 83, 3746-50 (1986)

Livak JL, et al. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening, Nature Genetics 9, 341-342 (1995)

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Research 29(9), 2002-2007 (2001)

Vandesompele J, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, Genome Biology 3(7), 1-12 (2002)

Minipack Copyright Notice (1999) University of Chicago. All rights reserved

Redistribution and use in source and binary forms, with or without modification, are permitted provided that the following conditions are met:

1. Redistributions of source code must retain the above copyright notice, this list of conditions and the following disclaimer.

2. Redistributions in binary form must reproduce the above copyright notice, this list of conditions and the following disclaimer in the documentation and/or other materials provided with the distribution.

3. The end-user documentation included with the redistribution, if any, must include the following acknowledgment:

"This product includes software developed by the University of Chicago, as Operator of Argonne National Laboratory."

Appendix

Appendix 1: 修理依頼書

修理依頼書にご記入（*は必ずご記入ください）の上、修理品に添付してお送りください。
（修理品 1 台につき 1 枚ご記入ください）

***依頼日　　年　　月　　日**

【*法人名（エンドユーザー様】

【*ご住所】

【*ご担当者様名】　　【ご連絡先】
（TEL）

【*代理店様名】

【*ご住所】

【*ご連絡先】　　【*ご担当者】
（TEL）

【*製品名】　　【製造番号（S/N）】　　【*付属品】

【*故障状況】

【*修理条件】
□保証期間中修理です。（保証期間　　年　　月　　日）

□作業前に見積は必要ありません。修理をお願い致します。

□修理金額（¥　　）以下の場合、見積りは必要ありません。修理をお願いします。

□作業前に見積が必要です。（故障箇所特定後の見積提出は、見積作業料を頂きます）
【その他/備考欄】

【注意事項】
お客様よりお預かりします機器に対し、細心の注意を払い作業を行いますが、プロトコールやデータは、不可抗力で消失する場合や作業の都合上で消去せざるを得ない場合があります。お客様で作成されましたプロトコールやデータに関して、修理をご依頼される前に必ずバックアップを行なってください。それらに関しては復旧できない場合がございますので予めご了解ください。
尚、弊社にてプロトコールやデータのバックアップ、リストア作業のご依頼は承っておりません。

【連絡先】	電話番号	Fax 番号
東京サービスセンター	03-6404-0330	03-6404-0332
大阪営業所	06-6308-6568	06-6308-3064
リペアセンター	03-6404-0381	03-6404-0332

修理品発送前に、発送先のご確認をお願い致します。

Appendix 2: デコンタミネーション確認のお願い

バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社に修理機器及び修理代替機、デモ機器を返送される場合、当該機器が生物学的有害物質（感染性物質）及び化学的有害物質の汚染がないことをご確認いただき、下記へご記入・ご署名の上、機器に添付してご送付ください。訪問対応の場合は、作業を行う前に弊社エンジニアへお渡しください。
弊社販売店様及び弊社従業員の安全を確保するためでございますので、ご理解とご協力をよろしくお願いいたします。
尚、安全の確認がとれない場合には、サービスの提供ができない場合がございますので予めご了承ください。

製品名：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　Serial No.（製造番号）：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

1. 上記装置は、感染性のあるサンプルを使用されましたか？
□ はい（感染性のある物質名：　　）　□いいえ
1-1. 上記で“はい”とご回答いただいた方へ、そのサンプルが接触した部分を安全が保たれる状態まで洗浄されましたか？
□ はい　□いいえ
1-2. 上記 1-1 で“ はい ”とご回答いただいた方へ、具体的にどのような方法で洗浄されましたか？

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

2. 上記装置は、有害な化学物質または放射性物質のサンプルを使用されましたか？
□ はい（危険性のある物質名：　　）　□いいえ
2-1. 上記で“はい”とご回答いただいた方へ、そのサンプルが接触した部分を安全が保たれる状態まで洗浄、除染されましたか？
□ はい　□いいえ
2-2. 上記 2-1 で“ はい ”とご回答いただいた方へ、具体的にどのような方法で洗浄、除染されましたか？

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

デコンタミネーション確認書

上記の装置を人体及び環境の安全を保つため、人体への感染や危険が無い状態であることを確認し、バイオ･ラッド ラボラトリーズ社員または、代理人へ作業を依頼したことを承認します。

ご記入日：　　年　　月　　日　　ご署名：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

会社(団体)名：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　ご職位：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

電話番号：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

＊ご署名は、実際に当該装置をご使用し、安全を確保していただいた方にお願いいたします。

Memo

Memo

製品の学術的なお問い合わせ
修理・メンテナンスに関するお問い合わせは
Tel：03-6404-0331　　Mail：life_ps_jp@bio-rad.com

バイオ･ラッド ラボラトリーズ株式会社
本社　　〒140-0002　東京都品川区東品川 2-2-24
Tel：03-6361-7000　　Fax：03-5463-8480
大阪　　〒532-0025　大阪市淀川区新北野 1-14-11
Tel：06-6308-6568　　Fax：06-6308-3064
福岡　　〒812-0013　福岡市博多区博多駅東 2-5-28
Tel：092-475-4856　　Fax：092-475-4858

M10496 1302A